



Skrb o životinjama u svrhu bolje znanosti

DIREKTIVA **2010/63/EU**
O ZAŠTITI ŽIVOTINJA KOJE SE KORISTE
U ZNANSTVENE SVRHE



**OKVIR ZA PROCJENU
OZBILJNOSTI**

Ni Europska komisija ni osobe koje djeluju u njezino ime ne odgovaraju za uporabu podataka iz ove publikacije.

Luxembourg: Ured za publikacije Europske unije, 2018.

© Europska unija, 2018.

Ponovna je uporaba dopuštena uz uvjet navođenja izvora.

Politiku ponovne uporabe dokumenata Europske komisije uređuje Odluka 2011/833/EU od 12. prosinca 2011. (SL L 330, 14.12.2011., str. 39.).

Za svaku uporabu ili reprodukciju fotografija ili druge građe koja nije zaštićena autorskim pravom EU-a dopuštenje treba zatražiti izravno od vlasnika prava.

Print ISBN 978-92-79-80580-6 doi:10.2779/7393 KH-01-18-213-HR-C

PDF ISBN 978-92-79-80554-7 doi:10.2779/540600 KH-01-18-213-HR-N

Sadržaj

Radni dokument o okviru za ocjenjivanje težine postupaka 1-19

Primjeri za prikaz procesa klasifikacije težine postupaka, svakodnevno ocjenjivanje i ocjenjivanje stvarne težine postupaka 21- 91

Nacionalna nadležna tijela za provedbu Direktive 2010/63/EU o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe

Radni dokument o okviru za ocjenjivanje težine postupaka

Bruxelles, 11. – 12. srpnja 2012.

Komisija je osnovala stručnu radnu skupinu za ocjenjivanje težine postupaka kako bi olakšala provedbu Direktive 2010/63/EU o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe. Sve države članice i glavne organizacije dionika bile su pozvane da imenuju stručnjake koji će sudjelovati u radu skupine.

Stručna radna skupina za ocjenjivanje težine postupaka sastala se dva puta: u prosincu 2011. s naglaskom na genetički izmijenjene životinje i u svibnju 2012., kada se raspravljalo o općem okviru za ocjenjivanje stvarne težine postupka za životinje.

Ovaj je dokument rezultat rada dvaju sastanaka stručne radne skupine, rasprava s državama članicama te pravnog doprinosa Komisije razumijevanju okvira za ocjenjivanje težine postupaka, njegovih sastavnica, sudionika, radnih alata i metoda. Dokument su odobrila nacionalna nadležna tijela za provedbu Direktive 2010/63/EU na sastanku održanom 11. – 12. srpnja 2012.

Izjava o odricanju od odgovornosti:

Tekst u nastavku namijenjen je kao smjernica za pomoć državama članicama i ostalima koje zahvaća ova Direktiva za zajedničko razumijevanje odredaba sadržanih u Direktivi. Sve komentare treba razmatrati u kontekstu Direktive 2010/63/EU o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe.

Samo Sud Europske unije ima pravno obvezujuću ovlast za tumačenje prava EU-a.

Sadržaj

Članci Direktive 2010/63/EU na koje se ovaj dokument odnosi.....	3
Opća pozadina.....	3
Opća načela ocjenjivanja težine postupaka.....	4
Razmatranja prije provedbe studije	5
Pokazatelji težine postupaka	6
<i>Kategorije visoke razine</i>	<i>6</i>
<i>Čimbenici koje treba uzeti u obzir pri ocjenjivanju stvarne težine postupaka</i>	<i>7</i>
Kako osigurati dosljednost ocjenjivanja i određivanja kategorije stvarne težine postupka.....	9
<i>Izrada obrasca za ocjenjivanje za pojedinačni postupak</i>	<i>10</i>
<i>Dosljednost u ocjenjivanju stvarne težine postupaka</i>	<i>10</i>
Tko bi trebao dati doprinos ocjenjivanju stvarne težine postupka?.....	11
Alati za praćenje, mediji i ostala načela.....	12
Dodatak I. - Glosar kliničkih zapažanja.	13
Dodatak II. - Osnovna literatura, smjernice i internetski izvori o ocjenjivanju dobrobiti životinja koje se koriste u znanstvenim postupcima.....	16

Članci Direktive 2010/63/EU na koje se ovaj dokument odnosi

- **Članak 4. stavak 3.** „Države članice osiguravaju poboljšanje uzgoja, smještaja i skrbi te poboljšanje metoda koje se koriste u postupcima tako da se moguća bol, patnja, stres ili trajna oštećenja nanosena životinjama uklone ili smanje na minimum.”
- **Članak 15. stavak 1.** „Države članice osiguravaju da se svi postupci svrstaju kao ‚nepovratni‘, ‚blagi‘, ‚umjereni‘ ili ‚teški‘ za svaki slučaj zasebno koristeći mjerila za klasifikaciju iz Priloga VIII.”
- **Članak 16. stavak 1. točka (d)** „u skladu je [ponovno korištenje] s veterinarskim mišljenjem, koje uzima u obzir životno iskustvo životinje.”
- **Članak 54. stavak 2.** „Države članice sakupljaju i javno objavljuju statističke podatke o korištenju životinja u postupcima, uključujući informacije o stvarnoj težini postupaka i o podrijetlu vrsta primata osim čovjeka u postupcima. ...”

Opća pozadina

Direktivom 2010/63/EU o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe zahtijeva se izrada očekivane procjene težine svakog postupka u projektu (članak 15.) i određivanje kategorije težine postupaka, koja može biti „nepovratna”, „blaga”, „umjerena” ili „teška”. U Prilogu VIII. navode se smjernice o čimbenicima koje treba uzeti u obzir pri razmatranju očekivane težine postupaka i neki primjeri za svaku kategoriju težine.

Člankom 54. o izvješćivanju zahtijeva se objavljivanje statističkih podataka, koje obuhvaća podatke o stvarnoj težini boli, patnje, tjeskobe ili trajnim oštećenjima koje životinje osjećaju (za razliku od očekivane procjene ili predviđanja težine postupaka koja se daje u trenutku vrednovanja projekta). Osim toga, stvarna težina svih prijašnjih postupaka ključno je načelo za određivanje može li se životinja ponovno koristiti u novim postupcima ili ne (članak 16.).

Tim se mjerama pružaju mogućnosti za unapređenje znanstvene kvalitete i dobrobiti u budućim revizijama prijedloga projekata te bi se, uključivanjem stvarne patnje koju životinja osjeća, trebala omogućiti veća transparentnost i razumijevanje utjecaja znanstvenih postupaka na dobrobit životinja.

Glavne koristi očekivane procjene, praćenja, ocjenjivanja i vođenja evidencije o stvarnoj težini postupaka obuhvaćaju:

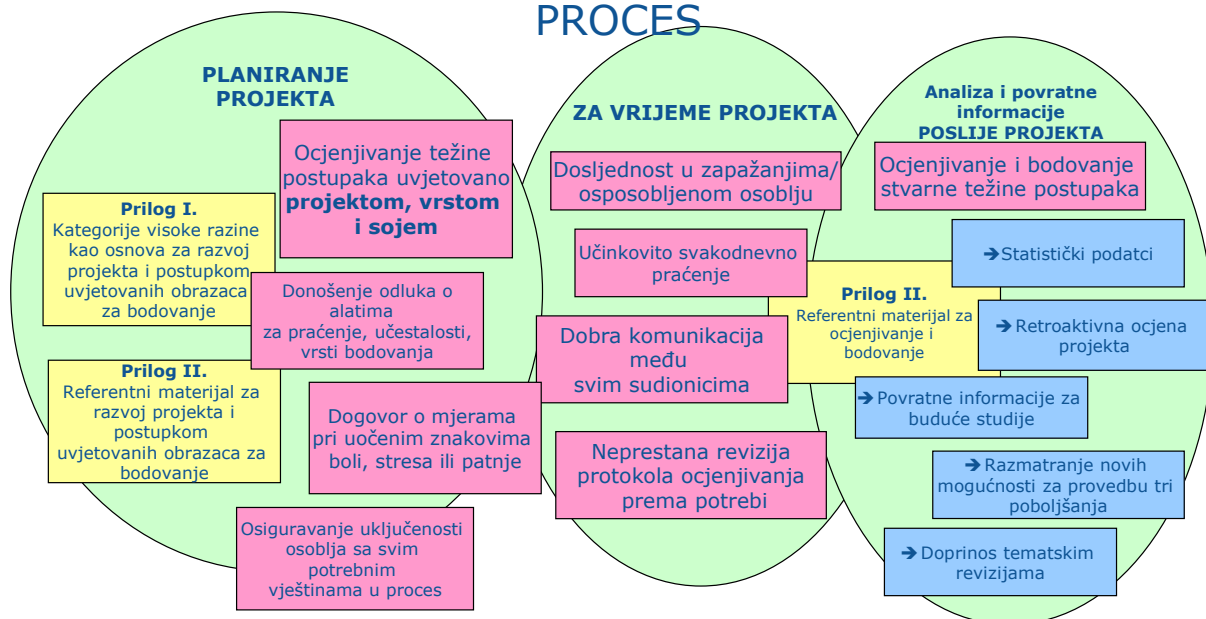
- mogućnosti osobito za uvođenje poboljšanja i ublažavanja patnje, iako će i buduće rasprave u načelu pružiti mogućnost razmatranja potrebe za korištenjem životinja (zamjena) i odgovarajućeg oblika studije za smanjenje korištenja životinja na minimum (smanjenje);
- unapređenje dobrobiti životinja, npr. ako se patnja ranije prepozna i ublaži;
- unapređenje transparentnosti, jer bi statistički podatci trebali bolje pokazati stvarne troškove dobrobiti za životinje;
- unapređenje komunikacije između osoba odgovornih za korištenje, pružanje skrbi i praćenje životinja;
- doprinos retroaktivnoj ocjeni projekata kada se ona provodi (članak 39.);

- unapređenje kvalitete znanstvenih podataka zbog veće dobrobiti;
- povećano znanje o ocjenjivanju težine postupaka i kliničkih znakova, što će potaknuti veću dosljednost u ocjenjivanju – pod uvjetom da se šire informacije o pristupima i rezultatima, npr. u časopisima, na forumima i sastancima;
- doprinos tečajevima za osposobljavanje istraživača, biotehnologa i veterinarara za laboratorijske životinje, ako se rezultati koriste kao primjeri;
- podatci temeljeni na dokazima koji se mogu koristiti u očekivanim procjenama oštećenja i koristi u sličnim, budućim projektima.

Opća načela ocjenjivanja težine postupaka

Ocjenjivanje težine postupaka treba biti **kontinuirani proces** koji počinje s prvim oblikovanjem studije, zatim se nastavlja svakodnevnom praćenjem za pojedinačnu studiju životinja za vrijeme projekta do ocjenjivanja „stvarne” težine postupaka poslije završetka studije, što pruža mogućnosti za definiranje daljnjih poboljšanja u budućim studijama.

OCJENJIVANJE TEŽINE POSTUPAKA– KONTINUIRANI PROCES



Primjer(i) projekta / postupkom uvjetovanog ocjenjivanja težine postupaka uključujući obrasce za svakodnevno ocjenjivanje, alate za bodovanje, odabir metoda praćenja i završnu ocjenu.

Ovakvim se pristupom nudi veća mogućnost uvođenja i provedbe načela tri R tijekom cijelog postupka, unapređenje komunikacije između svih sudionika i povećanje dosljednosti.

Za učinkovito ocjenjivanje težine postupaka potrebno je sljedeće:

- „**timski pristup**”, s doprinosom osoba koje imaju različito stručno znanje, iskustvo i prioritete, npr. istraživači, biotehnolozi i osoblje koje pruža skrb, dežurni veterinar;
- dobro planiranje;
- odgovarajuće kontinuirano obrazovanje i osposobljavanje svih sudionika u procesu;
- sustavi za svakodnevno ocjenjivanje težine postupaka koji su na odgovarajući način prilagođeni vrsti, soju i projektu, uključujući informirana i strukturirana zapažanja o životinjama u odgovarajućim intervalima (npr. veća učestalost za vrijeme i poslije postupaka);
- dobro informirani i učinkoviti protokoli za ocjenjivanje ponašanja i kliničkih znakova;
- analiza zapažanja za potrebe informirane procjene naravi i razine patnje;
- svijest o težini svakog postupka i mjeri koju treba poduzeti ako je se dosegne ili prekorači;
- dosljedan pristup općim ocjenama stvarne patnje (blaga, umjerena, teška) za statističko izvješćivanje;
- analiza učinkovitosti provedbe načela tri R i mogućnosti unapređenja u budućim studijama.

Razmatranja prije provedbe studije

Proces osiguravanja smanjenja težine u znanstvenim postupcima na minimum počinje u fazi **oblikovanja studije**, kad se razmatra je li potrebno i opravdano koristiti žive životinje za ispunjavanje znanstvenih ciljeva ili ne.

- Kad je korištenje živih životinja potrebno i opravdano, važno je osigurati odabir odgovarajućeg modela i robustan oblik studije.
- Treba definirati sve aspekte studije kojima bi se moglo izazvati bol, patnju, stres ili trajna oštećenja i obratiti pozornost na smanjenje njihovih učinaka na minimum, primjerice konzultiranjem, prema potrebi, literature, kolega, biotehnologa, veterinaru i tijela za dobrobit životinja.
- Preporučena očekivana kategorija težine postupaka treba se temeljiti na najvećoj očekivanoj težini za bilo koju životinju u studiji.
- Treba izraditi plan praćenja životinja koji odgovara i prilagođen je studiji. Standardizirana terminologija koju razumiju svi sudionici studije unapređuje dosljednost u izvješćivanju i tumačenju.
- Važno je osigurati dovoljno raspoloživog osposobljenog i stručnog osoblja za provođenje studije, praćenje životinja i pružanje skrbi životinjama.

Pokazatelji težine postupaka

Postoje ponašanja i klinički znakovi koji se mogu koristiti za ocjenjivanje težine postupaka promatranjem u kavezu (ili bazenu, zatvorenim boksovima itd.). Terminologija koja se koristi za njihovo opisivanje treba biti razumljiva svima koji sudjeluju u korištenju i praćenju životinja te im pružaju skrb. Za svaki sustav ocjenjivanja težine postupaka bitno je temeljito razumijevanje normalnog zdravlja, ponašanja i stanja dobrobiti vrsta (sojeva prema potrebi) koje se promatra.

Cilj bi trebao biti :

- postizanje najbolje moguće kvalitete života za životinju;
- osiguravanje prepoznavanja svake patnje izazvane znanstvenim postupcima i
- njezino smanjenje na minimum, ali i

očuvanje sukladnosti sa znanstvenim ciljevima.

Svaki sustav ocjenjivanja trebao bi učinkovito otkriti odstupanje od normalnog stanja zdravlja i dobrobiti te promatraču omogućiti vođenje evidencije te jasno i dosljedno ocjenjivanje svake životinje.

Za definiranje protokola za ocjenjivanje težine postupaka može se koristiti jednostavan, hijerarhijski pristup koji je na odgovarajući način prilagođen vrsti, soju, jedinkama i postupku. Procesom definiranja protokola za ocjenjivanje promatranjem u kavezu treba odrediti sve negativne učinke koji bi se mogli pojaviti tijekom životnog iskustva životinje, uključujući smještaj, uzgoj, skrb i postupanje sa životinjama te negativne učinke zbog znanstvenih postupaka i njihovih posljedica. Uzimanjem u obzir svih tih negativnih učinaka trebali bi se definirati pokazatelji koji se mogu koristiti za učinkovito ocjenjivanje dobrobiti životinje promatranjem u kavezu. Te pokazatelje treba prilagoditi vrsti, soju i eksperimentalnim postupcima u primjeni. Oni bi isto tako trebali biti jednostavni za dosljedno razumijevanje, prepoznavanje i vođenje evidencije. Međutim, važno je osigurati i instrument za prepoznavanje i evidencije o svim neočekivanim negativnim učincima, primjerice u obliku nevezanog teksta.

Kategorije visoke razine

U tekstu u nastavku navodi se niz glavnih kategorija „visoke razine” koje se primjenjuju na sve vrste kao polazište za oblikovanje sveobuhvatnog popisa određenih pokazatelja za svaki postupak ili program skrbi o životinjama. Cilj je izrada popisa dovoljnog broja pokazatelja za smanjenje rizika propuštanja znakova patnje na minimum za pojedinačnu studiju, a da se pri tome ne mora osmisliti pretjerano složeni, nepotrebno birokratski i vremenski zahtjevan sustav.

Kategorije visoke razine su:

- izgled
- tjelesne funkcije

- okoliš
- ponašanja
- pokazatelji za pojedinačni postupak
- slobodna zapažanja (ostala relevantna zapažanja).

Pokazatelji u svakoj od ovih kategorija mogu se prilagoditi bilo kojoj vrsti. Njih treba koristiti za izradu popisa uočljivih obilježja koja može ocijeniti odgovarajuće osposobljen pojedinac kako bi procijenio opće stanje zdravlja i dobrobiti životinje.

Te pokazatelje treba raspraviti i izabrati u dogovoru s osobom (osobama) odgovornom za nadzor dobrobiti životinja i prema potrebi s tijelom za dobrobit životinja. Zatim ih treba upotrijebiti za izradu sustava vođenja evidencije o svakodnevnim zapažanjima, praćenju i ocjenjivanju promatranjem u kavezu za pojedinačnu studiju.

U Dodatku I. navodi se primjer daljnje potpodjele tih kategorija visoke razine i korištenja za izradu odgovarajućih opservacijskih mjerila s pomoću zajedničke deskriptivne terminologije.

U Dodatku II. navode se informacije o smjernicama i internetskim izvorima koji mogu pomoći u izradi odgovarajućih procjena dobrobiti životinja koje se koriste u znanstvenim postupcima.

Čimbenici koje treba uzeti u obzir pri ocjenjivanju stvarne težine postupaka

Važno je primijetiti da, ovisno o određenoj situaciji, brojni elementi mogu imati pozitivan ili negativan utjecaj na težinu postupaka, a u obzir treba uzeti i razlike u vrstama.

Ocjenjivanje stvarne težine postupaka treba provoditi pojedinačno za svaki slučaj zasebno s pomoću zapažanja o životinjama tijekom svakodnevnog praćenja. Mogu se koristiti i dodatni parametri potrebni za potrebe studije gdje je to potrebno i dostupno. Primjerice, pokazatelji koji se ne mogu uočiti promatranjem (kao što je tjelesna temperatura, tjelesna težina, biokemijski parametri ili biotelemetrijski podatci kao što su otkucaji srca) isto tako mogu biti potrebni za studiju i treba ih uzeti u obzir u ocjenjivanju težine postupaka ako mogu dati dodatne, relevantne podatke.

Stvarna težina postupka koju treba prijaviti za svaku životinju treba biti na najvišoj razini koju je životinja osjetila za vrijeme postupka, a ne temeljena na težini na kraju postupka. Ocjenjivanje se nikako ne bi trebalo shvatiti kao jednostavan proces zbrajanja na primjer nekoliko blagih postupaka = umjerena težina postupka nego na ukupnoj ocjeni iskustva životinje od početka do kraja postupka.

Popis u tekstu u nastavku sadržava primjere vrste elemenata koje treba uzeti u obzir i ponderirati pri ocjenjivanju stvarne težine postupaka.

Postupak, tehnika

- kirurški/nekirurški;
- razina i trajanje zadržavanja životinja;
- uskraćivanje analgezije/anestezije kad bi inače jedno ili oboje bili potrebni;
- novi model ili postupak;
- elementi okoliša (uključujući smještaj i ograničavanje hrane/vode);
- stres/tjeskoba;
- ponavljanje postupka i intervali između ponavljanja (isto je tako potrebno uzeti u obzir učestalost i kombinaciju intervencija „ispod praga”);
- ponovno ili kontinuirano korištenje.

Vrsta, soj, faza razvoja, prethodno iskustvo

- **Ovo bi trebalo biti glavno načelo – za učinkovito predviđanje i ocjenjivanje težine postupaka potrebno je razumjeti biologiju te ponašanje vrste i soja (i ponekad jedinki);**
- **vrsta i soj;**
- podrijetlo životinje, npr. uzgojena za određenu svrhu, podivljala ili divlja;
- dobivanje životinja (uključujući prethodne uvjete smještaja) i prijevoz;
- genotip, fenotip, spol, dob, imunološki status;
- prirodno ponašanje i biologija (npr. relativna važnost različitih osjetila, kao što je vid za primata i miris za glodavce te kako laboratorijski okoliš može na njih djelovati);
- pojedinačni/grupni smještaj – opravdanje za pojedinačni smještaj društvenih životinja ili njihovo kratkotrajno ili dugotrajno odvajanje od formirane skupine;
- dnevni ritam, npr. utjecaj provedbe znanstvenih ili uzgojnih postupaka na noćne životinje pri dnevnom svjetlu;
- odvajanje od majke kod svih vrsta, uključujući glodavce;
- kognitivna sposobnost, svijest, pamćenje, percepcija o učincima postupaka.

Učestalost, intenzitet

- Nema izravne veze između učestalosti i težine postupaka, tj. povećana učestalost ne mora nužno dovesti do veće težine postupaka jer učinak težine ponovljenih postupaka ili tehnika ovisi o brojnim čimbenicima, kao što su intenzitet svake intervencije, njezino trajanje te vrsta i iskustvo jedinki.
- Kad se intervencije ponavljaju, postoji mogućnost prilagodbe, što može smanjiti težinu postupaka, npr. u primata osim čovjeka koji se koriste u blagim postupcima i obrnuto, ponavljanje može povećati težinu postupaka, npr. zbog očekivanja stresnog postupka ili nastupa hiperalgezije u slučaju kirurškog zahvata.
- Postoji mogućnost pozitivnog pojačavanja dresure ili „nagrada” nakon postupka.
- Treba zabilježiti najvišu razinu težine umjesto težinu „na razini oporavka”.

Trajanje učinka

- Trajanje je *povezano s intenzitetom (i stoga s težinom)*;
- mogućnost korištenja ranih humanih ili znanstvenih krajnjih točaka.

Učinkovitost poboljšanja

- odgovarajuća analgezija, anestezija i postoperativna njega;
- obogaćivanje okoliša – obogaćivanje okoliša i grupni smještaj društvenih životinja;
- smještaj, uzgoj i skrb – je li ih moguće poboljšati u skladu s postojećom najboljom praksom ili postupak zahtijeva ograničenja kao što je boravak u manjim prostorima (npr. metabolički kavezi), rešetkasti pod ili izlaganje uvjetima u okolišu koji izazivaju stres;
- dresura životinje za suradnju ili olakšavanje prilagodbe postupcima;
- učinkovitost protokola za ocjenjivanje promatranjem u kavezu.

Kumulativna težina postupka

- U postupku koji obuhvaća nekoliko koraka/intervencija u obzir treba uzeti cjelokupno životno iskustvo svake životinje, pri kojem ograničavanja sposobnosti poboljšanja smještaja ili potreba za čestim hvatanjem, postupanjem sa životinjama i zadržavanjem životinja itd. mogu utjecati na težinu postupka;
- prethodni postupci, u slučaju ponovnog korištenja;
- pri razmatranju ponovnog korištenja treba uzeti u obzir životno iskustvo, uključujući elemente kao što su dobivanje životinja (npr. rano „odbijanje”) i prijevoz.

Kako osigurati dosljednost ocjenjivanja i određivanja kategorije težine postupka

U fazi oblikovanja studije u načelu je potreban doprinos odgovarajućih znanstvenika, biotehnologa, veterinaru i osoblja koje pruža skrb kako bi se osigurala dostupnost odgovarajućih podataka za donošenje informiranih odluka o stvarnoj težini na kraju postupka. Konačno određivanje stvarne kategorije težine postupka proizlazi iz analize–evidencija opažanja o ponašanju, kliničkim znakovima i ostalim relevantnim parametrima promatranjem u kavezu.

Elementi koji pridonose dosljednosti su:

- uključivanje višestrukog stručnog znanja, iskustva i prioriteta – „timski pristup”;
- osposobljavanje za uporabu protokola za svakodnevno ocjenjivanje (uključujući zajedničku terminologiju koja se koristi za opisivanje zapažanja);
- stručno znanje o zdravlju, dobrobiti i ponašanju životinja;
- redovita revizija rezultata;
- komunikacija između svih osoba odgovornih za provedbu studije i praćenje životinja (od gore prema dolje, od dolje prema gore, između i unutar);
- nadzor (lokalno (npr. tijelo za dobrobit životinja), regionalno, nacionalno, na razini EU-a).

U obzir treba uzeti sljedeće ključne mjere za osiguravanje dosljednosti u ocjenjivanju stvarne težine postupaka:

Izrada obrasca za ocjenjivanje za pojedinačni postupak

- Treba izraditi obrasce za ocjenjivanje koji su prilagođeni vrsti, soju i studiji te ih uskladiti prije početka projekta.
- U izradi obrazaca za ocjenjivanje za pojedinačnu studiju treba učinkovito koristiti sve dostupne i relevantne podatke, primjerice prethodno iskustvo, rezultate *in vitro* ili *in silico* studija, pretraživanje literature, podatke iz pokusnih studija i kliničke znakove uočene u ljudi ili ostalih životinja.
- Podatci o parametrima koje treba promatrati i o tome kako provoditi promatranje trebaju biti na raspolaganju pri promatranju kaveza.
- Očekivana razina kategorije težine postupaka djelomično će „diktirati” razinu potrebnog uključivanja na operativnoj razini, potrebu za timskim pristupom za vrijeme praćenja i osobe koje trebaju biti uključene u stvarno promatranje i proces vođenja evidencije. One osobe koje izrade protokol za ocjenjivanje za pojedinačnu studiju trebale bi provesti i/ili potvrditi završnu ocjenu stvarne težine postupka.
- Ovisno o složenosti studije, mogli bi se koristiti posebni obrasci za ocjenjivanje posebnih sastavnica, npr. standardni obrazac za kirurški zahvat / perioperativnu njegu u kombinaciji s prilagođenim protokolom za ocjenjivanje studije.
- U nekim slučajevima, obrasci za ocjenjivanje za pojedinačnu studiju mogli bi uključivati i podatke koji se odnose na upravljanje kolonijom, npr. podatci o uzgoju i rastu genetički izmijenjenih životinja.

Dosljednost u ocjenjivanju stvarne težine postupaka

Ocjenjivanje stvarne težine provodi se na kraju postupka i zahtijeva donošenje ocjene o ukupnoj težini koju je životinja stvarno osjetila na temelju svakodnevnog ocjenjivanja i uzimanja u obzir provedenih postupaka.

- Jedan pristup koji se obično koristi je definiranje „blage”, „umjerene” i „teške” razine za svaki pokazatelj koji se koristi u svakodnevnom ocjenjivanju i zatim donošenje ocjene o njihovoj težini za svaki slučaj zasebno.
- **Kao i kod svakodnevnog praćenja, bitno je prilagoditi mjerila stvarnog ocjenjivanja postupku, vrsti i soju;** npr. gubitak tjelesne težine od 10 % će imati vrlo različite posljedice na zdravlje i dobrobit mladog štakora koji je u razvoju, odraslog miša s brzo rastućim tumorom ili odraslog psa.
- Uzimanje u obzir vremenskog razdoblja u kojem se neki od tih pokazatelja javljaju isto tako je važan čimbenik, posebice za gubitak težine i potrošnju hrane/vode.

Ocjena se donosi s pomoću svakodnevne evidencije o ocjenjivanju i u obzir se uzima postupak koji se provodi na životinji, duljina trajanja negativnih učinaka i ponovno korištenje

životinje. Iako će to neizbježno obuhvaćati određeni stupanj subjektivnosti, pravilnim osposobljavanjem promatrača ta subjektivnost bi se trebala smanjiti.

Određivanje stvarne težine postupaka ako životinje uginu

- Ako životinja uginu, tj. ne izvrši se eutanazija, to može biti bilo posljedica eksperimentalnog postupka bilo drugih nepovezanih uzroka.¹
- Stvarna težina postupka za životinje koje uginu trebala bi se prijaviti kao „teška” osim ako se može donijeti informirana odluka da životinja nije osjetila jaku patnju prije smrti.
- Ako nije vjerojatno da je smrti prethodila jaka patnja, kategorija stvarne težine postupka trebala bi odraziti iskustvo poznato prije smrti. Treba propisno razmotriti čimbenike kao što su učestalost praćenja, korištenje analgezije itd.
- „(Trajno) oštećenje” može osjetiti samo živa životinja.

Treba izraditi primjere koji ilustriraju proces klasifikacije težine postupka, svakodnevno ocjenjivanje i završnu ocjenu stvarne težine postupka te ih staviti na raspolaganje znanstvenoj zajednici.

Tko bi trebao dati doprinos ocjenjivanju stvarne težine postupka?

- Promatranje i vođenje evidencije o učincima često su proces odvojeni od ocjenjivanja stvarne težine postupka.
- Treba definirati jasne odgovornosti kako bi se osiguralo učinkovito svakodnevno praćenje životinja s odgovarajućom podrškom i nadzorom.
- Treba uspostaviti proces provjeravanja kako bi se potaknula dosljednost, npr. uspoređivanjem rezultata ocjenjivanja koje su dobile različite osobe.
- Uloge za promatranje i praćenje životinja te ocjenjivanje stvarne težine postupaka trebale bi biti fleksibilne i prilagodljive na temelju složenosti i težine dotične studije – iako pravna odgovornost za osiguravanje otkrivanja patnje i njezina smanjivanja na minimum ostaje na osobi imenovanoj u odobrenju projekta.
- Tijelo za dobrobit životinja trebalo bi imati i ulogu na institucionalnoj razini zbog osiguravanja dosljednosti.
- Nacionalni odbori i nadležna tijela isto tako mogu pridonijeti promicanju dosljednosti.

¹ U svrhu statističkog izvješćivanja, stvarna težina postupaka ponajprije bi se trebala odnositi na težinu eksperimentalnih postupaka, a ne na neočekivane događaje kao što su epidemije bolesti ili poplave u kavezima. Te vrste neočekivanih događaja odnose se na zdravstvene probleme ili prakse uzgoja i pružanja skrbi, a ne na oštećenja zbog postupaka. Međutim, treba ih zabilježiti, dalje istražiti i pratiti kako bi se spriječilo njihovo ponovno pojavljivanje.

Alati za praćenje, mediji i ostala načela

- Korištenje obrazaca za bodovanje treba uzeti u obzir u fazi planiranja projekta.
- Obrasci za bodovanje trebaju biti što jednostavniji, ali dovoljno detaljni te prilagođeni vrsti studije.
- Mogu se koristiti prethodno izrađeni obrasci za ocjenjivanje ako odgovaraju studiji, vrsti i soju.
- Elektroničko vođenje evidencije može pomoći u osiguravanju dosljednosti i olakšati pristup svim relevantnim podacima.
- Preporučuje se uporaba standardiziranog jezika i terminologije.
- Zabilježeni podatci trebaju biti što je više moguće objektivni.
- Prednosti i nedostatke (i) numeričkog bodovanja i (ii) „binarnih” sustava promatranja (u kojem su pokazatelji označeni kao „prisutan” ili „odsutan”) treba uzeti u obzir za svaki slučaj zasebno.
- Sve vrste evidencije o zapažanjima trebaju uključivati instrument dodavanja nevezanog teksta, kao i prethodno određenih pokazatelja kako bi se mogla zabilježiti neočekivana zapažanja.
- Bitno je učinkovito osposobiti sve relevantno osoblje i osobito pokriti ocjenjivanje težine i dobrobiti te tehnike praćenja.
- Treba uspostaviti komunikacijski plan koji će obuhvatiti sve relevantno osoblje, koji bi trebao uključivati mehanizam brzog komuniciranja neočekivanih rezultata svim odgovarajućim pojedincima i, prema potrebi, nadležnom tijelu.
- Praćenje bi trebalo biti razmjerno očekivanim učincima – postupci koji bi mogli izazvati „jaku” patnju u načelu će zahtijevati češće i detaljnije praćenje.
- Treba imati jasna mjerila za intervenciju, primjerice ako se primijete određeni parametri ili ako se približi prethodno određenoj razini patnje. Sve relevantno osoblje treba znati koja su to mjerila, što učiniti i s kime kontaktirati ako se ona pojave.

Ako se proces ocjenjivanja težine postupka provede učinkovito, životinje i sve osoblje koje sudjeluje u njihovoj skrbi i korištenju imat će koristi od unapređene dobrobiti životinja, znanstvene utemeljenosti i transparentnosti.

Dobra unutarnja i vanjska komunikacija o procesu ocjenjivanja težine postupaka i primjeni tri poboljšanja donijet će još veće koristi.

Dodatak I.

Glosar kliničkih zapažanja

Uspješnost svakog programa ocjenjivanja težine postupaka ovisi o izboru pokazatelja dobrobiti koji:

- su odmah i pouzdano prepoznatljivi;
- su učinkoviti u pružanju dobrih mjera dobrobiti;
- su relevantni za znanstvenu studiju, vrstu i soj (prema potrebi);
- su praktični za provedbu i pretjerano ne uznemiruju životinju i
- omogućuju dosljedno mjerenje, tumačenje i analizu.

Zajednički pristup vođenju evidencije o kliničkim zapažanjima stoga je poželjan cilj jer će pomoći u razvoju dosljednih pristupa klasifikaciji težine postupaka. Time će se olakšati usporedbe s kliničkim nalazima između studija te obavijestiti one koji se bave ocjenjivanjem težine postupaka.

Zapažanja su ustrojena oko sljedećih šest kategorija visoke razine:

Izgled / Tjelesne funkcije / Okoliš / Ponašanja / Pokazatelji za pojedinačni postupak / slobodna zapažanja

Kategorije visoke razine	Područja na koja se treba usmjeriti pri promatranju životinja	Posebni pokazatelji koje treba pratiti
Izgled	Tjelesno stanje	Gubitak/porast težine
		Pretila
		Mršava
		Rezultat tjelesnog stanja, ako je dostupan
	Stanje krzna i kože	Piloerекcija

		Neuredna/izostanak čišćenja
		Masno krzno
		Gubitak dlake
		Dehidracija – smanjena elastičnost kože
		Lezije na koži – oteklina; krasta; čir; ozljeda/rana
		Krv u urinu ili stolici
	Iscjedak	Iz očiju; nosa; urogenitalni; porfirinske mrlje u nekih vrsta, npr. u štakora
	Oči	Upale ili „bezizražajne”
		Zatvorene/poluzatvorene
		Oštećenje/ozljeda na oku (npr. ulceracija rožnice)
	Usta	Slinjenje
		Malokluzija/preizrasli zubi
	Ostalo	„Bolno lice” – npr. poluzatvorene oči i nabrekli nos u miševa
		Abdominalni grčevi
		Oticanje dijela tijela, npr. napuhnuti abdomen
Tjelesne funkcije	Respiracija	Ubrzano disanje (tahipneja)
		Otežano disanje (hiperpneja)
		Vrlo otežano disanje (dispneja)
		Hripanje ili drugi zvukovi pri disanju
	Unos hrane/vode	Povećan/smanjen
	Tjelesna temperatura	Povišena/snižena; izmjerena tjelesna temperatura ako je dostupna (npr. s pomoću mikročipa ili telemetrijskog uređaja, kontaktne ili nekontaktne termometrije); boja ekstremiteta u glodavaca
	Osjetila	Oštećeni vid i sluh ili narušena ravnoteža
Okoliš	Okoliš nastambe, uključujući stelju, materijal za gniježđenje, predmete za obogaćivanje okoliša	Prisutnost i konzistentnost fekalija
		Mokri ležaj, npr. zbog poliurije
		Prisutnost sadržaja povraćanja ili krvi
		Koristi li životinja predmete za obogaćivanje okoliša, npr. materijal za gniježđenje, kocke za žvakanje

Ponašanja	Društvena interakcija	Promjena normalnog temperamenta – ustrašene/agresivne interakcije s ostalim životinjama; tjeskoba (npr. naglašene reakcije na bijeg, skrivanje)
		Izolirana ili povučena od ostalih životinja u društvenoj skupini
	Nepoželjna ponašanja	Repetitivno/stereotipno ponašanje
		Pretjerano čišćenje krzna i brkova (glodavci), trihotilomanija
		Povećana agresivnost prema ljudima ili ostalim životinjama
	Držanje i pokretljivost	Neprirodno držanje
		Nepravilan hod; hramanje; izostanak kretanja / letargija / nevoljno kretanje pri stimulaciji
		Nekoordinirani pokreti
		Savijeni u abdomenu; nagnuta glava
	Ostalo	Drhtavica
Napadaji/konvulzije/grčevi		
Glasanje: spontano ili izazvano. <i>(Napomena: Neke vrste, npr. glodavci, obično se glasaju u ultrazvučnom spektru, pa je zvučno glasanje posebno zabrinjavajuće. Glasanje kunića isto je tako u načelu ljudima nečujno osim ako su životinje pod stresom.)</i>		
Pokazatelji pojedinačni postupak	Oni se definiraju na temelju pojedinog projekta, mogućih negativnih učinaka i očekivanih pokazatelja istih.	Primjerice, u modelu EAE oni bi mogli obuhvaćati: promjenu nijanse repa, slabost stražnjih udova, slabost prednjih udova, paralizu, gubitak funkcije mjehura.
Slobodna zapažanja	Program ocjenjivanja težine postupka uvijek bi trebao uključivati instrument za bilježenje svih zapažanja o neočekivanim negativnim utjecajima na dobrobit.	

Dodatak II.

Osnovna literatura, smjernice i internetski izvori o ocjenjivanju dobrobiti životinja koje se koriste u znanstvenim postupcima

American College of Laboratory Animal Medicine (ACLAM) (2006.) *Guidelines for the Assessment and Management of Pain in Rodents and Rabbits*, preuzeti na <http://www.tinyurl.com/65ez5vh>

Assessing the Health and Welfare of Laboratory Animals (AHWLA) training resource (materijal za osposobljavanje). Pogledati na <http://www.ahwla.org.uk/index.html>

Canadian Council on Animal Care (CCAC) *Welfare assessment*. Pogledati na <http://www.ccac.ca/> i kliknuti na mikrostranicu „Three Rs” (tri poboljšanja), a zatim potražiti „welfare assessment” (ocjenjivanje dobrobiti) (na engleskom ili francuskom jeziku)

Categorising the severity of scientific procedures on animals - Summary and reports from three round-table discussions uredile Jane A. Smith i Maggy Jennings u ime Boyd Group i RSPCA, srpanj 2004.

U izdanju RSPCA Research Animals Department

FELASA Working Group on the Reporting of Clinical Signs in Laboratory Animals (2012.) – (u tisku)

Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) (2008.) *Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals*. Washington, DC: National Academies Press

Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) (2009.) *Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals*. Washington, DC: National Academies Press. Pogledati na http://dels.nas.edu/animal_pain/

Johansen R, Needham JR, Colquhoun DJ, *et al.* (2006.) Guidelines for health and welfare monitoring of fish used in research. *Laboratory Animals* **40.**: 323. – 340.

Joint Working Group on Refinement (2011.) A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals. *Laboratory Animals* **45.**: 1. – 13.

Leach MC *et al.* (2008.) Identification of appropriate measures for the assessment of laboratory mouse welfare. *Animal Welfare* **17.**: 161. – 170.

National Centre for the Three Rs (NC3Rs) *Welfare assessment*. Pogledati na <http://www.nc3rs.org.uk/welfareassessment>

National Health and Medical Research Council (2008.) *Guidelines to Promote the Wellbeing of Animals Used for Scientific Purposes: The Assessment and Alleviation of Pain and Distress in Research Animals*. Canberra: Australian Government. Pogledati na <http://www.nhmrc.gov.au> i potražiti „pain and distress” (bol i stres)

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (2000.). *Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation*. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 19. Paris: OECD

Wells DJ, Playle LC, Enser WEJ, *et al.* Assessing the welfare of genetically altered mice. Cijeli tekst na <http://www.nc3rs.org.uk/gamice>. Sažetak u *Laboratory Animals* **40.**: 111. – 114.

Workman P *et al.* (2010.) Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *British Journal of Cancer* **102.**:1555. – 1577., preuzeti na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2883160/?tool=pubmed>

1.2 Preporuka korisnih časopisa za dodatno čitanje

<i>Applied Animal Behaviour Science</i>	http://www.applied-ethology.org/applied_animal_behaviour_science.html
<i>Animal Technology and Welfare</i>	http://www.iat.org.uk/publications/atw.htm
<i>Animal Welfare</i>	http://www.ufaw.org.uk/animal.php
<i>Contemporary Topics</i> (Aktualne teme) u <i>Laboratory Animal Science</i> i <i>Journal of the American Association for Laboratory Animal Science</i>	http://www.aalas.org/publications/index.aspx#ct
<i>Lab Animal</i> i <i>Lab Animal Europe</i>	http://www.labanimal.com/labanimal/index.html http://www.labanimaleurope.eu/
<i>Laboratory Animals</i>	http://la.rsmjournals.com/

1.3 Preporuka ključnih riječi za pretraživanje literature

Sljedeće ključne riječi korisne su za pretraživanje informacija o ocjenjivanju težine postupka (*severity assessment*):

<i>affect</i> / utjecati	<i>harm benefit assessment</i> / procjena štete i koristi	<i>positive indicators</i> / pozitivni pokazatelji	<i>severity scale</i> / ljestvica težine postupaka
<i>animal welfare</i> / dobrobit životinja	<i>humane endpoints</i> / humane krajnje točke	<i>positive welfare</i> / pozitivna dobrobit	<i>sickness behavio(u)r</i> / ponašanje koje ukazuje na bolest
<i>animal suffering</i> / patnja životinja	<i>needs</i> / potrebe	<i>qualitative behavio(u)r assessment</i> / kvalitativna procjena ponašanja	<i>stress</i> / stres
<i>assessment</i> / procjena, ocjena, ocjenjivanje	<i>objective assessment</i> / objektivna procjena/ocjena, objektivno ocjenjivanje	<i>quality of life</i> / kvaliteta života	<i>suffering</i> / patnja
<i>discomfort</i> / nelagoda	<i>pain</i> / bol	<i>refinement</i> / poboljšanje	<i>welfare assessment</i> / procjena, ocjenjivanje dobrobiti
<i>distress</i> / tjeskoba	<i>pain assessment</i> / procjena, ocjena, ocjenjivanje boli	<i>score sheets</i> / obrasci za bodovanje	<i>welfare indicator</i> / pokazatelj dobrobiti
<i>harm assessment</i> / procjena oštećenja	<i>pain measurement</i> / mjerenje boli	<i>scoring system</i> / s ustav bodovanja	<i>welfare outcomes</i> / rezultati dobrobiti

Literatura o klasifikaciji stvarne težine postupaka

CCAC (1998.) *Guidelines on: Choosing an Appropriate Endpoint in Experiments Using Animals for Research, Teaching and Testing*. Canadian Council on Animal Care, dostupno na: http://www.ccac.ca/en/_standards/guidelines (engleski) i http://www.ccac.ca/fr/_normes/lignes_directrices (francuski)

FELASA Working Group on Pain and Distress (1994.) Pain and distress in laboratory rodents and lagomorphs. *Laboratory Animals* **28.**: 97. – 112.

Jones HRP, Oates J and Trussell BA (1999.) An applied approach to the assessment of severity. U: Hendriksen CFM. & Morton DB (ur.), *Humane Endpoints in Animal Experiments for Biomedical Research*. Proceedings of the International Conference, 22-25 November 1998, Zeist, The Netherlands. Royal Society for Medicine Press Ltd., London str. 40. – 47.

LASA /APC (2008.) *Final Report of a LASA/APC Working Group to Examine the Feasibility of Reporting Data on the Severity of Scientific Procedures on Animals*. Dostupno na <http://www.lasa.co.uk/publications.html>

Morton, DB and Hau J (2011.) Chapter 18: Welfare assessment and humane endpoints. U *Handbook of Laboratory Animal Science, 3rd Edition, Volume 1 Essential Principles and Practices*. Hau J and Schapiro, SJ (ur.), CRC Press LLC, USA, str. 535. – 572.

Prescott MJ, Morton DB, Anderson D, Buckwell A, Heath S, Hubrecht R, Jennings M, Robb D, Ruane B, Swallow J and Thompson P (2004.) Refining dog husbandry and care, Eighth report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. *Laboratory Animals* **38. Suppl 1.**: S1.:1. – S1:94.

Wolfensohn S and Lloyd M (2003.) *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare, 3rd Edition*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford (4. izdanje u pripremi)

(Svi URL-ovi zadnji put provjereni 24. svibnja 2012.)

Primjeri za prikaz procesa klasifikacije težine postupaka, svakodnevno ocjenjivanje i ocjenjivanje stvarne težine postupaka

Bruxelles, 11. siječnja 2013

U *Radnom dokumentu o okviru za ocjenjivanje težine postupaka*, koji je izradila stručna radna skupina Europske komisije i koji su na sastanku u srpnju 2012. potvrdila nacionalna nadležna tijela za provedbu Direktive 2010/63/EU o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe predlaže se izrada primjera za prikaz „procesu klasifikacije težine postupaka, svakodnevnog ocjenjivanja i završnog ocjenjivanja stvarne težine postupaka” i njihovo stavljanje na raspolaganje znanstvenoj zajednici.

Slijedom toga, stručna radna skupina izradila je niz primjera kako bi pokazala primjenu procesa koji se opisuje u *Radnom dokumentu* na različite postupke. Namjena im je pomoći nadležnim tijelima, korisnicima, biotehnolozima, veterinarima i ostalom relevantnom osoblju u osiguravanju učinkovitog predviđanja, prepoznavanja, kada je to moguće ublažavanja i dosljednog ocjenjivanja boli, patnje i tjeskobe za vrijeme postupaka. Taj su dokument potvrdila nacionalna nadležna tijela za provedbu Direktive 2010/63/EU na sastanku održanom 23. – 24. siječnja 2013.

Nužno je da se pri korištenju ovih primjera u obzir uzmu brojni važni čimbenici:

- Pretpostavlja se da se svugdje **provodi dobra praksa** u pogledu smještaja, uzgoja i skrbi, postupaka poboljšanja, obrazovanja i osposobljavanja, ocjenjivanja stručnosti, pronalaženja i primjene aktualnih informacija o zamjeni, smanjenju i poboljšanju te oblikovanju pokusa.
- Obrasci za bodovanje koji se navode u primjerima namijenjeni su kao **dopuna procjeni, a ne kao zamjena procjene osposobljenog, stručnog i empatičnog osoblja**. Cilj je omogućiti sustavnije i objektivnije promatranje, vođenje evidencije i ocjenjivanje patnje, a ne poništiti stručnu procjenu.

- Svaki se primjer odnosi na **pretpostavljenu, ali realnu situaciju**. Ne bi bilo primjereno uključiti sve pojedinosti koje bi bile dostupne u praksi, ali navodi se dovoljno pojedinosti koje **objašnjavaju primjenu procesa**.
- Kako se navodi u *Radnom dokumentu*, **potrebno je promisliti o ocjenjivanju težine postupaka i prilagoditi ga** vrsti, soju i postupku koji se provodi u pojedinoj korisničkoj ustanovi. S tim u vezi, stručna skupina **izričito savjetuje da se** tablice i sustavi obrazaca za bodovanje **ne koriste** u zadanom obliku, **čak ni za iste postupke**. Potrebno je redovito provjeravati učinkovitost svih protokola za ocjenjivanje težine postupaka te ih prema potrebi revidirati.
- I **primjeri podliježu reviziji** jer se povećava znanje o pokazateljima boli, patnje i tjeskobe i mijenjaju se pristupi ocjenjivanju i klasifikaciji težine postupaka. Na svakom primjeru naveden je datum. Ažurirane primjere potražite na *web*-mjestu EK-a http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/interpretation_en.htm.
- **Poželjne su povratne informacije** o korisnosti primjera i prijedlozi novih postupaka koje bi trebalo uključiti. Komentare pošaljite na env-laboratory-animals@ec.europa.eu

Sadržaj

Model 1. – Onkološke studije	24
<i>Model 1.(a) Održavanje staničnih linija ljudskog tumora u imunokompromitiranim miševima bez dlake.....</i>	<i>25</i>
<i>Model 1.(b) Učinkovitost novih farmakoloških tvari na rast tumora</i>	<i>31</i>
Model 2. – Eksperimentalni autoimuni encefalitis (EAE) u miševa	39
Model 3. – Artritis	48
Model 4. – Moždani udar	59
Model 5. – Proizvodnja poliklonskih protutijela u kunića.....	72
Model 6. – Proizvodnja i održavanje genetski izmijenjenih (GA) životinja	79
<i>Model GeneA^{tm1a(Funding)Lab}</i>	<i>81</i>
<i>Model Tg(GeneB)^{Labcode}</i>	<i>87</i>
<i>Model GeneC^{tm1a(Funding)Lab}</i>	<i>89</i>

Ilustrativni primjeri kategorija težine postupaka

Model 1. – onkološke studije (1.a i 1.b)

Zadnji put ažurirano: 05/02/2013

1. Animalni modeli u onkološkim studijama (1.a i 1.b)

Opći kontekst: *in vivo* ocjenjivanje novih protukancerogenih tvari

Rak je glavni uzrok smrti u razvijenom svijetu, a starenje ljudske populacije neminovno će dovesti do porasta opterećenja od te bolesti. Vjerojatnost smrti od raka u EU-u prije starosne dobi od sedamdeset godina bila je 2010. oko jedan prema sedam. Stoga je potrebno razvijati nove, učinkovitije lijekove za liječenje raka. Prednost toga bit će smanjenje smrtnosti od raka i unaprjeđenje kvalitete života osoba koje u budućnosti obole od raka.

U razvoju novih lijekova za liječenje raka trenutačno se uz računalno modeliranje i *in vitro* metodologije kao što su ispitivanja stanične kulture koriste i animalni modeli. Nakon *in vitro* potvrđivanja selektivnosti i aktivnosti spojeva, u životinja se ispituju samo oni spojevi koji pokazuju povoljna svojstva. Studije podnošljivosti provode se na malim skupinama životinja kako bi se utvrdila najveća podnošljiva doza (*maximum tolerated dose* – MTD) i prikladnost režima doziranja prije opširnijih studija učinkovitosti.

Težina učinaka na životinje ovisi o modelima i namjeni studije. Primjerice, održavanje staničnih linija tumora ne bi trebalo imati značajan utjecaj na dobrobit pod uvjetom da se cijelo vrijeme poštuje dobra praksa, uključujući odgovarajuće praćenje životinja i prihvaćanje ranih humanih krajnjih točaka. Međutim, studije kojima se ocjenjuje nova terapija u metastaznim modelima vjerojatno će izazvati značajniju zabrinutost za dobrobit zbog nastanka višestrukog tumora i vjerojatnosti negativnih učinaka citotoksičnih lijekova.

Objavljen je velik broj smjernica za dobrobit i korištenje životinja u istraživanjima raka, primjerice u časopisu *British Journal of Cancer* (Workman *et al.* 2010.). U njima se detaljno prikazuju različiti animalni modeli tumora koji su dostupni, njihov utjecaj na životinje te kako se patnja može smanjiti na minimum.

Ovdje su navedena dva primjera koji prikazuju onkološke animalne modele s različitim kategorijama težine postupaka.

Literatura

Workman *et al.* (2010) Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *British Journal of Cancer* (2010.) 102.(11.), 1555. – 1577.; besplatno preuzimanje na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2883160/pdf/6605642a.pdf>

1. (a) – Održavanje staničnih linija ljudskog tumora u imunokompromitiranim miševima bez dlake

Neke stanične linije ljudskih tumora ne repliciraju se pouzdano u kulturi *in vitro* i stoga je povremeno potrebno da se ljudske stanične linije opišu i održavaju u ksenogenom *in vivo* modelu.

Studija

30 mužjaka miševa bez dlake BALB/C potkožno će dobiti injekciju stanične otopine od 10^3 HCT 116 u fiziološkoj otopini od 0,1 ml u lijevo bedro. Životinje će biti grupno smještene u kavezima s odvojenom ventilacijom za svaki kavez (IVC-ovi) sa steljom i materijalom za gnijezda. Svakodnevno će se provoditi ocjenjivanje dobrobiti životinja, a životinje će se vagati svaka 4 dana. Jedinkama će se opipavati tumor svaki drugi dan, a svaki otkriveni tumor mjerit će se mjernim šestarom svaki drugi dan. Eutanazija životinja izvršit će se 15. dana radi prikupljanja tumorskih stanica.

Prva očekivana procjena i razmatranje određenih poboljšanja i humanih krajnjih točaka

Što se životinjama radi ovom studijom?	Što će životinje osjetiti? Koliko će patiti? Od čega bi im moglo biti gore?	Kako će se patnja smanjiti na minimum?	
	Negativni učinci	Metodologija i intervencije	Krajnje točke
Održavanje imunokompromitiranih miševa	Životinje su prijemljive na infekcije.	<p>Smještaj u IVC-ovima; uzgojne prakse prilagođene smanjenju rizika od kontaminacije</p> <p>Životinje žive u grupama u obogaćenom okolišu radi smanjenja stresa.</p> <p>Ako se primijete znakovi stresa, agresivnosti ili nenormalnog ponašanja provodi se revizija uzgoja i skrbi.</p>	Usmrtit će se sve životinje koje pokažu znakove boležljivosti.
Potkožno davanje injekcija tumorskih stanica	Prolazna nelagoda nakon injekcije	<p>Injekcija se daje samo jednom.</p> <p>Injekcijom se daje odgovarajuća količina (najviše 0,2 ml).</p> <p>Životinje će se pomno pratiti u razdoblju neposredno nakon injekcije.</p>	Ako se nakon injekcije primijete tjeskoba ili nelagoda koji su jači od blagih bez brzog oporavka (vrlo rijetko), životinje će biti usmrćene na human način.

Rast tumora	<p>Može izazvati nelagodu ili utjecati na normalno ponašanje ili sposobnost kretanja.</p> <p>Može doći do infekcije ili ulceracije tumora (ali on ne bi trebao metastazirati).</p>	<p>Rast tumora mjeri se svakog drugog dana.</p> <p>Plan praćenja obuhvaća pomno promatranje držanja, hoda te veličine i stanja tumora.</p>	<p>Ako nastupi ulceracija tumora ili ako tumor sprječava normalno ponašanje, držanje ili sposobnost kretanja ili preraste 1,2 cm u promjeru (Workman <i>et al.</i> 2010.), životinje će biti usmrćene.</p>
--------------------	--	--	--

Analiza

Očekuje se da će životinje osjetiti samo **BLAGU** nelagodu te će biti usmrćene ako problemi sa zdravljem ili dobrobiti prerastu tu razinu.

Stoga je odgovarajuća kategorija očekivane težine postupka BLAGA.

Na kraju ovog modela nalazi se primjer ispunjenog obrasca za promatranje.

Klinička zapažanja

Sastavljen je osnovni obrazac za bodovanje s naglaskom na veličini tumora, tjelesnoj težini, držanju i hodu jer se ne očekuje mnogo ostalih kliničkih znakova. Ostavljen je prostor za upisivanje neočekivanih kliničkih znakova kao nevezanog teksta. Upisivanje oznake NAD (*no abnormality detected* – nije utvrđena nepravilnost) potvrđuje da su životinje pregledane i da nisu primijećene nepravilnosti. Dalje u tekstu navodi se primjer.

Rezultati

- Ni za jednu životinju nije zabilježen značajan gubitak težine.
- U 5 životinja nije primijećen razvoj tumora.

- U 25 životinja tumori su nastali na bedru. Ti tumori nisu sprječavali normalno ponašanje i 14. dana kad se izvršila eutanazija životinja u skladu s protokolom studije za prikupljanje tumorskih stanica iznosili su prema mjerenju najviše 1 cm.
- U jednom kavezu došlo je do agresivnog ponašanja i borbe. Jedna životinja imala je ugrizne rane na repu i leđima te je izdvojena u poseban kavez. Rane su lokalno dezinficirane svakog dana sve dok nisu zarasle, a životinja je ondje zadržana do kraja postupka.

Ocjenjivanje stvarne težine postupka

- 29 životinja završilo je studiju s blagom patnjom zbog injekcije i rasta tumora. Stvarna težina patnje ocijenjena je kao **BLAGA**. Jedna životinja imala je ugrizne rane koje su učinkovito zaliječene. Ta je životinja dodatno patila zbog posljedica napada, ali to nije bilo povezano s postupkom. Ti su incidenti učinkovito riješeni i patnja je smanjena na minimum. Iako je razina patnje koju je osjetila ova životinja bila umjerena, s obzirom na to da ovaj incident nije bio povezan s postupkom, stvarna težina povezana s postupkom koju je trebalo prijaviti smatrala se **BLAGOM**.

Primjer obrasca za promatranje (ispunjen za hipotetični slučaj)

Rast tumora u miševa bez dlake – postupak i obrazac za promatranje				
Kavez 1. – Brojevi miševa 1 – 5				
Datum	Postupak	Veličina tumora (cm)	Težina (g)	Klinička zapažanja – pomno provjerite držanje i hod
28.2.	Potkožna injekcija		1 – 21 2 – 22 3 – 21 4 – 22	Nema znakova problema s dobrobiti nakon injekcija

			5 – 22	
1.3.				Nije utvrđena nepravilnost (NAD)
2.3.	Palpacija			NAD
3.3.				NAD
4.3.	Palpacija		1 – 21 2 – 22 3 – 21 4 – 22 5 – 22	NAD
5.3.				NAD
6.3.	Palpacija			NAD
7.3.				Nešto agresivnog ponašanja; nema vidljivih rana
8.3.	Mjerenje tumora	1 – 0,1 2 – 0,1 3 – 0,1 4 – tumora nema	1 – 21 2 – 22 3 – 21 4 – 22	Miš 1. imao je ugrizne rane na repu i leđima – lokalno zbrinjavanje; premješten u pojedinačni smještaj. Osigurana kutija za gnijezdo za pojedinačno smještenu životinju, ali uklonjena iz kaveza s preostala četiri miša u slučaju da je bila uzrok agresivnosti.

		5 – 0,2	5 – 22	
9.3.				Dezinficirane rane mišu 1., dobro zarastaju; nema znakova agresivnosti među ostalim životinjama.
10.3.	Mjerenje tumora	1 – 0,2 2 – 0,1 3 – 0,1 4 – tumora nema 5 – 0,2		Dezinficirane rane mišu 1.
11.3.				Dezinficirane rane za miša 1.
12.3.	Mjerenje tumora	1 – 0,4 2 – 0,3 3 – 0,3 4 – tumora nema 5 – 0,5	1 – 22 2 – 22 3 – 21 4 – 21 5 – 23	Mišu 1. zacijelile rane, dezinfekcija prekinuta.
13.3.				NAD

14.3.	Izvršena eutanazija i prikupljanje tumorskih stanica.			
-------	---	--	--	--

1. (b) Učinkovitost novih farmaceutskih tvari na rast tumora – višefazni postupak

Namjena je studije je ocjenjivanje učinkovitosti novih tvari na smanjivanje ili suzbijanje rasta tumorskih stanica. Tumor mora dovoljno narasti prije početka liječenja (obično je dovoljno da bude 0,5 cm u promjeru) – zbog trajanja studije neki tumori mogu narasti do najviše 1,2 cm u promjeru, obično u kontrolnoj skupini koja dobiva pomoćno sredstvo. Citotoksični lijekovi mogu izazvati neke negativne učinke na dobrobit. 30 mužjaka miševa bez dlake BALB/C dobit će injekciju sporo rastućih tumorskih stanica (0,1 ml). Svakodnevno će se provoditi ocjenjivanje dobrobiti životinja, a životinje će se vagati jednom tjedno 3 tjedna za redom. Rast tumora mjerit će se s pomoću mjernog šestara 7. i 14. dana. 20. dana tumori će se ponovno izmjeriti, životinje će se randomizirati te će započeti liječenje u obliku interperitonealnih injekcija dva puta dnevno 7 dana.

Prva očekivana procjena i razmatranje određenih poboljšanja i humanih krajnjih točaka

Što se životinjama radi ovom studijom?	Što će životinje osjetiti? Koliko će patiti? Od čega bi im moglo biti gore?	Kako će se patnja smanjiti na minimum?	
	Negativni učinci	Metodologija i intervencije	Krajnje točke
Održavanje imunokompromitiranih	Životinje su prijemljive na infekcije.	Smještaj u IVC-ovima; uzgojne prakse prilagođene smanjenju rizika	Usmrtit će se sve životinje koje pokažu znakove interkurentnog

miševa		<p>od kontaminacije</p> <p>Životinje su grupno smještene u obogaćenom okolišu radi smanjenja stresa.</p> <p>Ako se primijete znakovi tjeskobe, agresivnosti ili nenormalnog ponašanja, provodi se revizija uzgoja i skrbi.</p>	<p>oboljenja.</p>
Potkožna injekcija tumorskih stanica	<p>Prolazna nelagoda nakon injekcije</p>	<p>Injekcija se daje samo jednom.</p> <p>Injekcijom se daje odgovarajuća količina (najviše 0,2 ml).</p> <p>Životinje se pomno prate u razdoblju neposredno nakon injekcije.</p>	<p>Ako se nakon injekcije primijete stres ili nelagoda koji su jači od blagih bez brzog oporavka (vrlo rijetko), životinje će biti usmrćene na human način.</p>
Rast tumora	<p>Može izazvati nelagodu ili utjecati na normalno ponašanje ili sposobnost kretanja.</p> <p>Može doći do infekcije ili ulceracije korištenog tumora (ali ne bi trebao metastazirati).</p>	<p>Svakodnevno promatranje životinja, redovito praćenje općeg zdravlja i rasta tumora</p> <p>Plan praćenja sadržavat će pomno promatranje sposobnosti kretanja, hod te veličinu i stanje tumora.</p> <p>Farmaceutske intervencije početak će kad tumor naraste 0,5 cm u</p>	<p>Ako dođe do ulceracije tumora ili ako tumor sprečava normalno ponašanje, držanje ili sposobnost kretanja ili preraste 1,2 cm u promjeru (Workman <i>et al.</i> 2010), životinje će biti usmrćene.</p>

		promjeru (izmjereno mjernim šestarom).	
Intraperitonealna injekcija nove farmaceutske tvari	Prolazna nelagoda nakon injekcije Citotoksični lijekovi mogu izazvati dijareju, gubitak težine, anoreksiju ili letargiju.	Životinje će se pomno pratiti u razdoblju neposredno nakon injekcije. Najveća količina iznosi 10 ml/kg dnevno 7 dana. Daju se najmanje doze (određuju se nakon studija o doziranju). Ocjenjivanje dobrobiti provodit će se s pomoću sustava kliničkog ocjenjivanja.	Ako gubitak težine bude veći od 20 % prvotne tjelesne težine, životinje će biti usmrćene. Usmrtit će se životinje koje ne jedu ili imaju dijareju dulje od 48 sati. Humana krajnja točka odredit će se kao gornja granica kliničke ocjene.

Analiza

U ovom je slučaju, kao posljedica veličine tumora, povećane mogućnosti ulceracije, učestalosti injekcija i negativnih učinaka danih lijekova, odgovarajuća **kategorija očekivane težine postupka UMJERENA**.

Može li granica težine postupka biti **BLAGA**?

Nije vjerojatno, osim ako se znanstveni ciljevi mogu postići s ranijim krajnjim točkama, primjerice smanjenje najveće veličine tumora. To bi uključivalo i injekciju lijekova u dozi za koju je poznato da ne izaziva značajne negativne kliničke učinke. U takvim okolnostima može se smatrati da je odgovarajuća težina postupka **BLAGA**.

Klinička zapažanja

Na kraju ovog modela naveden je primjer obrasca za promatranje i uzorak obrasca za ocjenjivanje.

Rezultati

Od 30 mužjaka miševa BALB/C, njih 25 korišteno je za ocjenjivanje učinkovitosti. 10 životinja dobilo je lijek B u dozi H, 10 lijek B u dozi X i 5 lijek C u dozi Y.

Ocjenjivanje stvarne težine postupka

- 3 životinje nisu razvile tumor i izvršena je eutanazija jer se nisu mogle upotrijebiti za pokus. – **BLAGA**
- 2 životinje razvile su ulceraciju na mjestu davanja injekcije tumora prije početka liječenja i izvršena je eutanazija. – **UMJERENA**
- 10 životinja koje su dobile lijek B u dozi H imale su tumore koji su ostali relativno mali, bez značajnoga gubitka tjelesne težine i kliničkih znakova. –**BLAGA**
- U 7 životinja koje su dobile lijek B u dozi X došlo je do smanjenja veličine tumora, gubitka tjelesne težine od 15 % i rijetke stolice, ali su zadržane do kraja eksperimenta. – **UMJERENA**
- U 3 životinje koje su dobile lijek B u dozi X došlo je do smanjenja veličine tumora, gubitka tjelesne težine od 15 %, rijetke stolice, anoreksije i velike letargije te su usmrćene na human način 25. dana. – **TEŠKA**
- U 5 životinja koje su dobile lijek C u dozi Y došlo je do kontinuiranog rasta veličine tumora i porasta tjelesne težine. Osim rasta tumora, nije bilo drugih kliničkih znakova. Kad je veličina tumora prerasla 1,2 cm, izvršena je eutanazija tih životinja. – **UMJERENA**

Primjer obrasca za ocjenjivanje

Životinja br.				
Datum	1.6.	2.6.	3.6.	4.6.
Izgled				
Tjelesna masa				
Stanje dlake				
Tjelesna funkcija				
Dispneja i/ili tahipneja				
Unos hrane				
Okoliš				
Rijetke stolice ili dijareja				
Krv u dijareji				
Ponašanja				
Postupanje sa životinjama				

Agresivnost				
Neprirodan hod				
Neprirodno držanje				
Nevoljno kretanje				
Postupkom uvjetovani pokazatelji				
Veličina tumora				
Ulceracija tumora				
Tumorom otežano kretanje				
Ukupan rezultat				
Ostala zapažanja				

Primjeri kliničkih ocjena

Izgled	Ocjena
Tjelesna masa	
Gubitak mase od 5 – 10 %	1
Gubitak mase od 11 – 15 %	2
Gubitak mase od 16 – 20 %	3
Gubitak mase od 20 % +	HEP
Stanje dlake	
Krznno malo neuredno	1
Lagana piloerekcija	2
Izražena piloerekcija	3
Tjelesna funkcija	
Tahipneja (ubrzano disanje)	1
Dispneja (otežano disanje)	3
Okoliš	
Rijetke stolice ili dijareja	1

Mjere	
Ocjena 1	Izvršite reviziju učestalosti praćenja.
2	Razmotrite dodatnu njegu, npr. više tekućine.
4	Posavjetujte se s veterinarom.
6	Izvršite humanu krajnju točku.

Krv u dijareji	HEP
Ponašanje	
Napetost i nervoza pri postupanju sa životinjama	1
Izražena tjeskoba pri postupanju sa životinjama, npr. drhtanje, glasanje, agresivnost	3
Sposobnost kretanja	
Malo neprirodan hod/držanje	1
Izraženo neprirodan hod/držanje	2
Značajni problemi s pokretljivošću / nevoljno kretanje	3
Nepokretljivost >24 h	HEP
Postupkom uvjetovani pokazatelji	
Veličina tumora >1,2 cm	HEP
Ulceracija tumora	HEP
Tumorom otežano kretanje	HEP

Ilustrativni primjeri kategorija težine postupaka
Model 2. – eksperimentalni autoimuni encefalitis (EAE) u miševa
Zadnji put ažurirano: 05/02/2013

Opći kontekst

Eksperimentalni autoimuni encefalitis (EAE) koristi se za modeliranje raznih aspekata multiple skleroze (MS) u glodavaca i primata. MS je složeni multiformni neurološki poremećaj koji se javlja u mladih osoba. Simptomi su upala, demijelinizacija i gubitak aksona. Animalni modeli koriste se za istraživanje fiziopatologije ove bolesti i za ocjenjivanje mogućih zaštitnih ili kurativnih strategija, uključujući imunomodulaciju, imunološku zaštitu, aksonalnu regeneraciju i obnovu mijelina. Multiformna i multifazna obilježja MS-a zahtijevaju korištenje odgovarajućih modela za rješavanje određenih pitanja koja se odnose na različite faze bolesti.

EAE obuhvaća pokretanje djelovanja imunološkog sustava usmjerena na mijelin, koje inducira upalu u središnjem živčanom sustavu i otvaranje krvno-moždane barijere, što može izazvati ozbiljan neurološki sindrom u animalnom modelu, iza kojeg bi trebao uslijediti djelomični oporavak u prvoj kroničnoj fazi remisije i relapsa. Ta faza vezuje se uz upalu i reverzibilnu demijelinizaciju. Nakon 9 – 10 tjedana životinja ulazi u progresivni oblik, koji se vezuje uz kroničnu demijelinizaciju i gubitak aksona. U toj fazi mogu se ocijeniti različite terapijske strategije. Potrebno je pomno izabrati humane i znanstvene krajnje točke uzimanjem u obzir ciljeva studije.

Literatura

Emerson MR *et al.* (2009.) Enhancing the ability of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis to serve as a more rigorous model of Multiple Sclerosis through refinement of the experimental design. *Comparative Medicine***59.**: 112. – 128.

Miller SD *et al.* (2010.) Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the mouse. *Current Protocols in Immunology***88.**: 15.1.1 .– 15.1.20.

Weissert R (ur.) (2012.) *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis – Models, Disease Biology and Experimental Therapy*. Published by In Tech, DOI: 10.5772/1190, <http://www.intechopen.com>

Wolfensohn S *et al.* (u pripremi) Reducing suffering in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.

Studija

U ovom se primjeru provodi indukcija EAE u četiri mužjaka i četiri ženke miševa Biozzi ABH (soj u širokoj uporabi za koji se vjeruje da ima visoku translacijsku vrijednost) kako bi se ocijenila moguća terapija za MS. U početnoj fazi planiranja projekta korisnik razmatra svaki mogući negativni događaj za životinje i utvrđuje moguće uzroke patnje u dogovoru s biotehnologom i osobljem koje pruža skrb i dežurnim veterinarom. Oni su istražili poboljšanja, koja se provode u ovom projektu. Miševi će biti društveno smješteni u skupine od po četiri životinje istog spola. Posebna pozornost će se obratiti na lokalni okoliš jer će životinje s EAE-om imati značajne motorne poremećaje. Kavezi će imati tvrdo dno, stelju od piljevine, odgovarajuća skloništa i materijal za gniježđenje te kocke za žvakanje. Životinje će dobiti inflamatorni adjuvans radi indukcije EAE-a te će ih se pratiti za vrijeme oporavka i u kroničnoj fazi remisije i relapsa (od 9 do 10 tjedana). Nakon nastanka progresivnog oblika, u miševa će se ocijeniti kandidatski terapijski spojevi u trotjednoj studiji.

Prva očekivana procjena i razmatranje određenih poboljšanja i humanih krajnjih točaka

Što se životinjama radi ovom studijom?	Što će životinje osjetiti? Koliko će patiti? Od čega bi im moglo biti gore?	Kako će se patnja smanjiti na minimum?	
	Negativni učinci	Metodologija i intervencije	Krajnje točke
Višestruke injekcije inflamatornog adjuvansa	Nelagoda ili bol zbog pripreme injekcije Moguća reakcija na mjestu davanja injekcije, koja izaziva iritaciju ili	Injekcijom se daju male doze potkožno na više mjesta (ne u jastučice na šapama ili korijen repa). Adjuvans i pomoćno sredstvo	Ako se nakon injekcije primijeti neprolazna umjerena bol ili tjeskoba, životinje će biti usmrćene na human način.

	nelagodu.	formulirani za minimalnu iritaciju. Životinje će se pratiti nakon injekcije.	
Indukcija EAE-a – početni teški neurološki sindrom iza kojeg slijedi faza oporavka	Paraliza, koja bi mogla izazvati stres ili tjeskobu; promjena tonusa repa, slabost stražnjih udova; smanjena pokretljivost, paraliza udova; urinarna disfunkcija (inkontinencija ili retencija)	Urinarna funkcija pratit će se svakodnevnim provjeravanjem mjehura. Mjehur će se prazniti ručno prema potrebi u slučaju retencije (pomno praćenje znakova boli ili stresa nakon pražnjenja mjehura). Ako su životinje inkontinentne, kavez će se često provjeravati zbog vlažne stelje i materijala za gniježđenje. Prema potrebi obavlja se zamjena svježim materijalima. Osiguravaju se odgovarajuća skloništa i materijal za gniježđenje.	HEP za bilo koji od sljedećih kriterija: bilateralna paraliza udova > 24 h bilateralna paraliza stražnjih udova do 5 dana samosakaćenje perzistentna urinarna retencija / nemogućnost pražnjenja mjehura pareza (gubitak pokreta; blaga paraliza) gubitak težine od 35 %* životinja ne jede ili ne pije > 24 h nakon nastupa bolesti izostanak oporavka od EAE 3 tjedna nakon nastupa kliničke bolesti klinički znakovi interkurentnog oboljenja, npr. grbljenje
	Značajan gubitak mase (npr. do 35 %)	Osiguran stalan pristup vodi i hrani u posudama na dnu kaveza. Provodi se svakodnevno praćenje tjelesne težine i stanja i češće ocjenjivanje (prema potrebi) nakon	

		početka gubljenja težine. Životinjama će se osigurati kocke natopljene hrane i tekućine, s potkožnim dodatcima prema potrebi .	
Klinička faza remisije/relapsa	Kronični neurološki deficiti	Smanjuju se svi stresori, uključujući razine buke. Sobna temperatura će se prema potrebi povisiti s pomoću jastučića za grijanje, dodatne stelje i materijala za gniježđenje.	
Davanje nove terapijske tvari (u progresivnom obliku)	Nelagoda zbog injekcije Nuspojave ili izostanak učinkovitosti tvari	Životinje će se pomno promatrati nakon injekcije kandidatske tvari.	Ako se primijete gore navedeni pokazatelji ili ako bude teških nuspojava izazvanih novom terapijskom tvari, životinje će biti usmrćene na human način.

* Gubitak mase od 35 % ekstremna je krajnja točka koja zahtijeva čvrsto znanstveno opravdanje. U ovom slučaju neizbježan je značajan gubitak težine i životinje se od toga mogu oporaviti uz odgovarajuću podršku, npr. dodatno zagrijavanje i hranjenje, uključujući hranjenje rukom prema potrebi. Za ovu konkretnu studiju određena je krajnja točka od 35 % kao način smanjenja zahtjeva za indukcijom EAE u novim naivnim životinjama, koja bi bila znatno viša za „konvencionalniju” krajnju točku (npr. 20 %).

Analiza

Odgovarajuća kategorija očekivane težine postupka je TEŠKA jer se očekuje da će postupak izazvati teška oštećenja za opću dobrobit i stanje životinja.

Može li težina postupka biti UMJERENA?

Iako bi očekivana težina ovog modela uvijek trebala biti TEŠKA iz prethodno navedenih razloga, retrospektiva klasifikacija težine postupka može biti UMJERENA ovisno o trajanju studije i provedbi ranih humanih krajnjih točaka kako se ovdje navodi.

Klinička zapažanja

Za vrijeme studije miševе su pratili biotehnolozi i osoblje koje pruža skrb s pomoću sustava obrazaca za kliničko ocjenjivanje koji su prilagođeni protokolu u dogovoru s korisnicima, biotehnolozima, osobljem koje pruža skrb i veterinarom. On sadrži parametre koji se odnose na težinu, stanje dlake, tonus repa, kontrolu mjehura, uspravljanje, hod, parezu i uznapredovale znakove (ležanje na boku; gotovo potpuna paraliza; ubrzano, polagano ili duboko disanje). Budući da je projekt obuhvaćao teške postupke, korisnik je vrlo pomno pratio životinje i redovito provodio kontinuirane revizije težine postupka u dogovoru s tijelom za dobrobit životinja, biotehnologom i dežurnim veterinarom. Dolje u tekstu prikazan je ilustrativni primjer obrasca za ocjenjivanje.

Primjer odgovarajućeg obrasca za ocjenjivanje

Tablica. Obrazac za kliničko ocjenjivanje koji se koristi za miševе s EAE

Datum:					
Izgled					
Tjelesna masa					
Stanje dlake					

Tjelesna funkcija					
Kontrola mjehura					
Tonus repa					
Respiracija					
Okoliš					
Stanje gnijezda					
Ponašanje					
Društveno ponašanje					
Hod					
Postupkom uvjetovani pokazatelji					
Ležanje na boku					
Vrijeme uspravljanja					
Pareza					
Paraliza					
Ostala zapažanja					
(Nevezani tekst)					

Napomene: Svaki pokazatelj ocjenjuje se u skladu sa sustavom u tablici dolje u tekstu u kojem se (primjerice) „1” unosi u tablicu pokraj „tonusa repa” ako se primijeti otežano dizanje repa, a „2” pokraj „stanje gnijezda” ako je gnijezdo neuredno.

Tablica. Sustav ocjenjivanja pokazatelja u obrascu za kliničko ocjenjivanje EAE

Ocjene:	1 = blaga kategorija	2 = umjerena kategorija	3 = teška kategorija
Gubitak mase	Do 10 %	Od 10 do 20 %	Od 20 do 35 %
Stanje dlake	Malo neuredna	Izostanak čišćenja	Izražena/produljena piloerekcija
Kontrola mjehura – inkontinencija	Dokazi o gubitku kontrole, npr. mala količina urina u gnijezdu	Izražajnije „bježanje” urina	Inkontinencija
Kontrola mjehura – retencija	Mjehur se može opipati, ali se prazni pri postupanju sa životinjama.	Za pražnjenje mjehura potreban malo veći trud.	Nesposobnost mokrenja bez pomoći; znakovi nelagode/stresa za vrijeme ili nakon ručnog pražnjenja
Tonus repa	Otežano dizanje ili savijanje repa	Gubitak tonusa u distalnoj polovici repa	Gubitak tonusa u cijelom repu
Respiracija: ubrzano, polagano ili duboko disanje	Neznatno	Umjereno	Izraženo
Stanje gnijezda	Malo neuredno	Pokušaja uređivanja gnijezda, ali gnijezdo neuredno	Nema gnijezda
Društveno ponašanje	Ne očekuju se promjene kod blage	Smanjena interakcija s ostalim	Znatno smanjena interakcija;

	patnje; ocjenjivanje počinje s 2	životinjama	pasivnost
Hod	Nespretan	Životinja vuče jedan stražnji ud.	Životinja vuče oba stražnja uda.
Ležanje na boku	Ne očekuje se promjena kod blage ili umjerene patnje; ocjenjivanje počinje s 3.	Ne očekuje se promjena kod blage ili umjerene patnje; ocjenjivanje počinje s 3.	Prisutno
Vrijeme uspravljanja	Polagano uspravljanje kada se životinju stavi na leđa	Izraženo otežano uspravljanje	Nesposobnost ispravljanja u roku od 5 sekundi nakon stavljanja na leđa
Pareza	Spora abukcija prednjih udova kada se životinju stavi na leđa	Smanjeni raspon abdukcije prednjih udova kada se životinju stavi na leđa	Nema abdukcije prednjih udova
Gotovo potpuna ili potpuna paraliza	Ne očekuju se promjena kod blage ili umjerene patnje; ocjenjivanje počinje s 3.	Ne očekuje se promjena kod blage ili umjerene patnje; ocjenjivanje počinje s 3.	Prisutna

Ocjenjivanje stvarne težine postupka

Na kraju postupka pregledava se obrazac za ocjenjivanje za svaku pojedinu životinju kako bi se vidjela visina ocjene pokazatelja i njihovo mijenjanje tijekom vremena.

- Dva su miša izgubila 8 % tjelesne mase nakon indukcije EAE, imala su malo neurednu dlaku i sporu abdukciju prednjih udova, ali svi ostali pokazatelji dobili su ocjenu „2” u prvih 5 dana projekta. Te su ocjene zatim vraćene na „1” ili „0” za svaki pokazatelj u fazi relapsa/remisije i za vrijeme ispitivanja lijeka. Težina postupka = **UMJERENA**.

- Tri su miša izgubila između 22 i 32 % tjelesne mase i dobila su kombinaciju ocjena od „3”, „2” i „1” u fazi relapsa/remisije i za vrijeme ispitivanja lijeka. Težina postupka = **TEŠKA**.
- Jedan je miš izgubio 37 % tjelesne mase u postindukcijskoj fazi i izvršeno je humano usmrćivanje. Težina postupka = **TEŠKA**.
- Dva su miša izgubila 15 i 18 % tjelesne mase i dobila su kombinaciju ocjena od „2” i „3” za sve ostale pokazatelje u prva 4 dana studije. Zatim su dobili kombinaciju ocjena od „1” i „2” u fazi relapsa/remisije i za vrijeme ispitivanja lijeka. Težina postupka = **TEŠKA**.

Paraliza nije primijećena i dokazano je da je teško ocijeniti disanje promatranjem kaveza pa je oboje izbrisano iz obrazaca za evidenciju. U polju za nevezani tekst često se bilježilo povećano vrijeme u skloništu kao rani pokazatelj patnje, pa je to dodano u obrasce za buduće projekte.

6 životinja smatra se **TEŠKOM**, 2 životinje smatraju se **UMJERENOM** kategorijom.

Prilike za novu primjenu 3 poboljšanja

Nakon ocjenjivanja stvarne težine postupka korisnici su se posavjetovali s kolegama i u literaturi potražili nova poboljšanja. Utvrđena su sljedeća dodatna poboljšanja:

- prethodno hranjenje životinja visokoenergetskim dodatcima prehrani, kao što su žele i kondenzirano mlijeko, prije davanja adjuvansa,
- korištenje manje doze adjuvansa,
- korištenje protokola alternativnih studija kako bi se smanjilo trajanje projekta.

Ona su dodana protokolu za buduće studije, za potrebe uspoređivanja razina stvarne težine postupaka kako bi se utvrdila učinkovitost poboljšanja.

Ilustrativni primjeri kategorija težine postupaka

Model 3. – artritis

Zadnji put ažurirano: 05/02/2013

Opći kontekst

Animalni modeli artritisa koriste se za proučavanje patogeneze bolesti i ocjenjivanje mogućih lijekova protiv artritisa za kliničku uporabu. Važni kriteriji za odabir modela stoga sadržavaju morfološke sličnosti s ljudskom bolešću i kapacitet modela za predviđanje učinkovitosti potencijalnih terapijskih spojeva u ljudi.

Animalni modeli koji se često koriste za reumatoidni artritis su: štakorski adjuvantni artritis, štakorski kolagenski artritis tipa II, mišji kolagenski artritis tipa II i artritis induciran antigenima u nekoliko vrsta (Bendele, 2001.). Injekcija se obično daje u korijen repa jer to omogućuje dobar imunogeni odgovor, iako se u literaturi spominju i ostala mjesta davanja injekcija. Postoje i značajne razlike u soju ovisno o prijemljivosti, težini i latentnosti na nastup artritisa. Na primjer, prijemljivost genetski izmijenjenih (GA) linija na razvoj artritisa može biti modificirana (povećana ili potisnuta) ovisno o učincima izmjena gena. U animalnim modelima artritisa koji se često koriste i stoga su dobro provjereni, nastup bolesti će biti predvidljiv, a tehnike ocjenjivanja vjerojatno će biti dobro definirane i karakterizirane. U takvim modelima mogu se koristiti višestruka ocjenjivanja, uključujući analizu hoda i uporabu Von Frayevih vlakana za razliku od jednostrukih opservacijskih mjera.

Imajte na umu da je potrebno redovito pregledavati dostupne sojeve, protokole i poboljšanja kako bi se za postavljeno znanstveno pitanje izabrali oni koji su odgovarajući za svaki slučaj zasebno (Joe *et al.*, 1999.).

U ovom se primjeru predstavlja primjer kolagenskog artritisa tipa II u štakora, koji može izazvati jaku patnju. Stoga je čvrsto znanstveno opravdanje apsolutni zahtjev za njegovo korištenje. Štakori se imuniziraju protiv heterolognog kolagena tipa II, koji stvara lezije slične onima koje se vide u ljudskom reumatoidnom artritisu (Bendele, 2001.). Obilježja poliartritisa koji iz toga proizlazi su izraženo razaranje hrskavice

povezano s odlaganjem imunskih kompleksa na površinama zglobova, resorpcijom kostiju i periostealnom proliferacijom, umjerenim do izraženim sinovitisom i periartikularnom upalom.

Literatura

Bendele, A.M. Animal models of rheumatoid arthritis, *J Musculoskel Neuron Interact* 2001.; 1.(4.):377. – 385.

Jasemian Y *et al.* (2011.) Refinement of the collagen induced arthritis model in rats by infrared thermography. *Br. J. Med. & Med. Res.* **1.(4.):** 469. – 477.

Joe, B., Griffiths, M.M., Remmers, E.F., Wilder, R.L. Animal models of rheumatoid arthritis, *Current Rheumatology Reports* 1999.; 1. 139. – 149.

Studija

U ovom primjeru artritis će se inducirati u 18 mušjaka i 18 ženki štakora Lewis ponavljanjem injekcija FIA (Freundov nekompletni adjuvans) i kolagena. Injekcija će se dati u korijen repa. Dnevna terapija početak će 10 dana kasnije (D10), kada se razvije artritis, i zatim će se nastaviti svakodnevno još 14 dana (do D24). Cilj studije bit će ispitivanje mogućih terapijskih tvari. Pregledani su prethodno objavljeni podaci o srodnim spojevima kako bi se vidjelo hoće li davanje analgezije ometati znanstvene ciljeve i utvrđeno je da će se time doći do stapanja u pokusu. Analgezija se stoga neće dati za vrijeme razvoja artritisa ili kontrolnim skupinama, a posebnu pozornost obratit će se na nefarmakološke metode ublažavanja boli (npr. uzgojna poboljšanja) kako bi se olakšala patnja.

Sve će se životinje svakodnevno promatrati i vagati te ocjenjivati u općem obrascu za kliničko ocjenjivanje te će se provesti ispitivanje na D0 (prije prve injekcije) i na D10 (prije početka terapije), D13, D16, D20 i D24. Ispitivanje će obuhvaćati neizravno mjerenje slabljenja tjelesne funkcije kao što je promjer zglobova (mjeri se mjernim šestarom) i kliničko ocjenjivanje prema sustavu bodovanja artritisa. Humane krajnje točke primijenit će se na temelju kliničkih rezultata (pogledati u tekstu u nastavku).

Ocjenjivanje novih terapijskih farmaceutskih tvari u štakorskom modelu artritisa (kolagen tipa II)

TEŠKA težina postupka

Što se životinjama radi ovom studijom?	Što će životinje osjetiti? Koliko će patiti? Od čega bi im moglo biti gore?	Kako će se patnja smanjiti na minimum?	
	Negativni učinci	Metodologija i intervencije	Krajnje točke
Potkožne injekcije govedskog kolagena tipa II u Freundovu nekompletnom adjuvansu (FIA) u korijen repa do tri puta	<p>Stres od zadržavanja</p> <p>Prolazna bol, umjereno oticanje na mjestu davanja injekcije i nelagoda jedan ili dva dana</p> <p>Moguća ulceracija kože, ali nije vrlo vjerojatna s FIA.</p>	<p>Empatični pristup i stručno postupanje sa životinjama u postupcima</p> <p>Izabrana standardizirana doza i formulacija za smanjenje oticanja i boli na minimum.</p>	<p>Ako se ulceracija kože nastavi ili dođe do infekcija, životinje će biti usmrćene na human način.</p>
Razvoj artritisa (D0-D10)	<p>Nelagoda, bol, invaliditet i tjeskoba; životinje bi mogle pokazati znakove lošeg zdravlja, uključujući tromost, manjak apetita, nevoljko kretanje, gubitak mase, oticanje zglobova, glasno glasanje pri postupanju sa životinjama</p>	<p>Pomno kliničko promatranje s upotrebom općeg obrasca za kliničko ocjenjivanje, s većom učestalošću praćenja pri nastupu kliničkih znakova (obično od oko D8 – D10)</p> <p>Tijekom studije osigurava se dodatna</p>	<p>Životinje će biti usmrćene na human način kad ostvare prethodno utvrđene kliničke rezultate za humane krajnje točke (pogledati tablicu u nastavku).</p>

		<p>mekana stelja i materijal za gniježđenje.</p> <p>Neotežani pristup vodi i hrani (npr. na dnu kaveza) tijekom studije</p> <p>Koristi se sustav za kliničko ocjenjivanje artritisa kojim se ocjenjuje stupanj oticanja i broj zahvaćenih zglobova.</p>	
<p>Davanje farmakoloških tvari (ispitne i kontrolne, dva puta dnevno) potkožno ili intraperitonealno (od D10 do D24)</p>	<p>Prolazna nelagoda nakon injekcije</p> <p>Na temelju prethodnih podataka o životinjama ne očekuje se da će farmakološke tvari izazvati negativne učinke.</p>	<p>Svakodnevno pomno kliničko praćenje s pomoću općeg obrasca za kliničko ocjenjivanje</p>	<p>Ako postoje značajni negativni učinci, primjenjuju se humane krajnje točke.</p>
<p>Ocjenjivanje učinaka farmakoloških tvari na težinu artritisa (D0, D10, D13, D16, D20 i D24)</p>	<p>Ovisno o metodama koje se koriste, može se pojaviti dodatna prolazna bol ili nelagoda, npr. korištenje Von Freyevih vlakana, korištenje mjernog šestara, zahtjev za postupanje sa životinjama.</p>	<p>Pomno kliničko praćenje</p> <p>Smanjiti učestalosti promatranja (na najnižu razinu u skladu sa znanstvenim ciljevima) dok se životinja ne oporavi.</p>	<p>Pogledati tablicu u tekstu u nastavku.</p>

Napomena

O sustavu za kliničko ocjenjivanje i ocjenjivanje artritisa treba razgovarati s istraživačem, veterinarskim kirurgom, biotehnolozima i osobljem koje skrbi o životinjama te ga dogovoriti prije početka studije.

Analiza

Kao posljedica vjerojatnosti značajnog kliničkog utjecaja na životinju, koji bi se mogao nastaviti nekoliko tjedana, smatra se da je odgovarajuća kategorija očekivane težine postupka **TEŠKA**.

Može li težina biti UMJERENA?

Smanjenje težine na kategoriju umjerena ovisi o namjeni studije. Na primjer, kod čestog detaljnog promatranja životinja i ondje gdje postoji mogućnost provođenja ranih krajnjih točaka (npr. pri nastupu hramanja ili nakon razdoblja blagog hramanja jednog uda ili pri korištenju *in vivo* metoda slikanja za otkrivanje ranih promjena u patologiji zglobova) postupak se može klasificirati kao UMJEREN. Te rane krajnje točke (npr. završavanje studije 6. dana nakon slikanja) moguće su u projektima koji istražuju rane upalne promjene. Profilaktično liječenje (koje počinje prije potpunog razvoja artritisa) novim farmaceutskim tvarima koje imaju jake protuupalne učinke i obuzdavaju razvoj potpunog artritisa isto tako može dovesti do smanjenja kategorije težine na **UMJERENU**. Međutim, cilj vrste studije koja se ovdje prikazuje je ocjenjivanje terapija za potpuno razvijeni artritis, tako da kategorija težine postupka ostaje **TEŠKA**.

Može li težina biti iznad gornje razine?

U skladu s člankom 15. stavkom 2. Direktive „*Države članice osiguravaju da se postupak ne izvede ako bi prouzročio jaku bol, patnju ili stres, za koje je vjerojatno da bi bili dugotrajni te ih se ne bi moglo olakšati.*” Ova bi studija mogla izazvati jaku patnju od nekoliko tjedana, što bi se trebalo smatrati dugotrajnim. Kad bi se teški artritis razvio u sve četiri noge životinja i patnja životinja ne bi olakšala, studija bi bila iznad gornje granice težine postupka i bilo bi je potrebno značajno poboljšati ili pozvati se na „zaštitnu klauzulu” (članak 55. Direktive) i podnijeti zahtjev Komisiji za izdavanje odobrenja.

Međutim, u ovom primjeru postoje utvrđene mjere za smanjenje patnje – s uzimanjem u obzir znanstvenog cilja – uključujući poboljšanje sastava, isporuke i izbora adjuvansa, kojima se razvoj artritisa omogućuje samo u stražnjim nogama, osigurava ugodan okoliš i neotežani pristup hrani i vodi, sveobuhvatni sustav praćenja i humane krajnje točke.

Ovaj se projekt stoga ne bi smatrao iznad gornje granice i može se izdati odobrenje koje podliježe inače pozitivnoj procjeni projekta, uključujući reviziju štete i koristi.

U tekstu u nastavku prikazan je primjer obrasca za kliničko ocjenjivanje za promatranje artritičnih štakora iz dana u dan.

Datum:	Dan 1.	Dan 2.	Dan 3.	Dan 4.
Izgled				
Tjelesna masa				
Izostanak čišćenja				
Dehidracija				
Tjelesne funkcije				
Dispneja				
Tahipneja				
Ponašanje				
Nevoljno kretanje				
Letargija/apatija				
Nepokretnost				
Glasanje				
Postupkom uvjetovani pokazatelj				

Ocjena artritične šape (vidi tablicu 2.)				
Ostala zapažanja				
(Nevezani tekst)				
Ukupan rezultat				

Napomena: Svaki pokazatelj ocjenjivalo se u skladu sa sustavom iz tablica 1. i 2. u tekstu u nastavku. Na primjer, „1” bi se unosio u obrazac za ocjenjivanje pokraj „izostanak čišćenja” (tablica 1.), a „5” pokraj „postupkom uvjetovani pokazatelj” ako su dva stražnja uda dobila ocjenu „3” i „2” (tablica 2.). Postupci i krajnje točke navedeni u tekstu u nastavku uzimaju u obzir zahtjeve za izbjegavanje jake patnje kad je god to moguće, ali ne za usmrćivanje životinja na human način prije dobivanja dovoljno podataka, zbog čega bi bilo potrebno koristiti nove, naivne životinje.

**Tablica 1. Sustav ocjenjivanja pokazatelja koji se koriste u obrascu
Za kliničkog ocjenjivanje**

	Ocjena
<u>Izgled</u>	
Normalan gubitak mase < 5 %	0
Gubitak mase od 5 – 10 %	1
Gubitak mase od 11 – 15 %	2
Gubitak mase od 16 – 20 %	3
Gubitak mase od 20 % +	HEP
Izostanak čišćenja	1
Upala koža/dehidracija	1
<u>Tjelesne funkcije</u>	
Dispneja	2
Tahipneja	1

**Tablica 2. Postupkom uvjetovani pokazatelj – ocjena
artristične šape**

0	Normalna
1	Eritema i oticanje jednog gležnja
2	Eritema i oticanje gležnja i proksimalne polovice tarzalnih zglobova
3	Eritema i oticanje gležnja i svih tarzalnih zglobova do metatarzalnih zglobova
4	Eritema i oticanje cijele šape, uključujući prste

Ovaj sustav za ocjenjivanje artritisa koji se koristi kao postupkom uvjetovani pokazatelj temelji se na povećanim razinama oticanja i periartikularne eriteme. Ocjene se temelje na fizičkom pregledu i vizualnoj provjeri te se koriste za izračunavanje „indeksa artritisa” koji se definira kao zbroj ocjena za oba stražnja uda.

<u>Ponašanje</u>	
Nevoljno kretanje	1
Letargija/apatija	2
Trajna nepokretnost < 24 h	3
Nepokretnost > 24 h	HEP
Glasanje pri postupanju sa životinjama	1
Glasanje, napetost i nervoza pri postupanju sa životinjama	2
Glasanje pri pomicanju/spontano	3
Postupkom uvjetovani pokazatelj	
Ocjena artritične šape (tablica 2.)	0 – 8

HEP: provedena humana krajnja točka, bez obzira na prisutnost ili odsutnost ostalih kliničkih znakova

Primjeri odgovarajućih intervencija u odgovoru na ukupne kliničke rezultate

Postupci koje treba poduzeti	Ukupna ocjena
Povećati učestalost praćenja; razmotriti dodatne tekućine/skrb	≥ 4
Revidirati napredak s veterinarom	5 – 15
Humana krajnja točka	≥ 16

Napomena: Ukupne ocjene preuzete su iz obrazaca za kliničko bodovanje i popunjene u skladu sa sustavima ocjenjivanja u tablicama 1. i 2. Primjerice, životinja s gubitkom tjelesne mase od 12 %, dokazi o smanjenom čišćenju i oticanju oba stražnja gležnja imala bi ukupnu ocjenu 5.

Retrospektivna ocjena:

Provedena je imunizacija 36 štakora govedskim kolagenom tipa II u Freundovu nekompletnom adjuvansu (FIA). Sve su životinje razvile artritis: ocjene artritične šape bile su 6 na D10. Sve su životinje pokazale gubitak mase od 5 – 10 %. Mjerenja promjera zgloba pokazala su značajnu promjenu u odnosu na osnovne podatke. Svakodnevna klinička zapažanja uključivala su izostanak čišćenja, nevoljno kretanje, apatiju, glasanje pri postupanju sa životinjama (za vrijeme promatranja i promjene kaveza), smanjeni unos hrane i razdoblja nepokretnosti.

- U skupini koja je primila fiziološku otopinu korišteno je 12 životinja. Najveća ocjena artritične šape bila je između 6 i 8 za sva mjerenja (D13, D16, D20 i D24). Mjerenja promjera zgloba isto su tako pokazala značajne poraste u odnosu na osnovnu vrijednost u svakoj vremenskoj točki. Klinički rezultati bili su u rasponu od 4 do 8, s gubitkom tjelesne mase između 5 i 15 %, osim u jedne životinje, koja je ostvarila gubitak težine od 21 % na D17 i koja je usmrćena na human način.

Retrospektivna ocjena: TEŠKA

- 12 životinja primilo je **malu** dozu LIJEKA A. U svih životinja ocjena artritične šape nije se razlikovala od onih u skupine koja je primila fiziološku otopinu do D16. Na D20 jedna je životinja imala ocjenu šape od 8, a ostale su imale od 6 do 7.

Na D24 pet životinja pokazalo je nešto nižu ocjenu artritične šape (od 5 do 7). Klinički znakovi tih pet životinja pokazivali su mali napredak, tjelesne težine i dalje su bile smanjene za 5 do 10 %; pokretljivost u kavezu isto je tako ostala smanjena.

Ostalih sedam životinja nije pokazalo smanjene artritične i kliničke znakove u usporedbi sa skupinom koja je primila fiziološku otopinu.

Retrospektivna ocjena: TEŠKA

- 12 životinja primilo je **veliku** dozu LIJEKA A. Na D13 ocjene artritične šape bile su između 4 i 6; promjeri zglobova isto tako nisu pokazivali značajno smanjenje. Klinički znakovi obuhvaćali su izostanak čišćenja i gubitak tjelesne težine od < 10 %. Na D16 ocjene artritične šape snizile su se na 4, a promjeri zglobova pokazali su značajno smanjenje. Tjelesne težine stabilizirale su se na D16. Nevoljno kretanje još se primijetilo u nekoliko životinja. Od D20 nadalje oticanje zglobova smanjilo se na između 2 i 4. U kavezu su primijećena normalna ponašanja. Tjelesna težina oporavila se na razine prije postupka.

Retrospektivna ocjena: TEŠKA

Napomena: Do kraja studije u trećoj skupini od dvanaest životinja ispitna tvar „LIJEK A” koju su životinje dobile u **velikoj** dozi pokazala se učinkovitom u smanjivanju kategorije stvarne težine na umjerenu. Međutim, budući da je model zahtijevao potpuno razvijeni artritis u svih životinja prije početka liječenja, kada su životinje pokazale kliničke znakove u skladu s kategorijom „teška”, kategorija stvarne težine postupka za te životinje ostala je **teška**.

Budući da ovaj projekt obuhvaća teške postupke, korisnik redovito provodi kontinuiranu reviziju težine, u dogovoru s tijelom za dobrobit životinja, biotehnologom i dežurnim veterinarom kako bi se osigurala kontinuirana primjena načela 3R.

Ilustrativni primjeri kategorija težine postupaka

Model 4. – moždani udar

Zadnji put ažurirano: 05/02/2013

Opći kontekst

Moždani udar definira se kao gubitak ili promjena normalne tjelesne funkcije koja proizlazi iz nedovoljnog dotoka krvi u dio mozga. Unatoč boljem razumijevanju patofiziologije vaskularne ozljede mozga, učinkovito liječenje moždanog udara i dalje je važna nezadovoljena medicinska potreba te su istraživanja i dalje u tijeku kako bi se utvrdile odgovarajuće preventivne i terapijske mjere.

U ljudskih bolesnika mogu se vidjeti tri različite vrste moždanog udara: ishemijski, intracerebralno krvarenje i subarahnoidno krvarenje, ali većina danas dostupnih animalnih modela temelji se na ishemijskom tipu. Modeli moždanog udara po svojoj naravi predstavljaju izazov sa stajališta dobrobiti životinja. Ključne su dobre interakcije i komunikacija između svih pojedinaca uključenih u znanstvene postupke (veterinara, istraživača, biotehnologa i osoblja koje skrbi za životinje) kako bi se osigurala odgovarajuća ravnoteža između postizanja valjanog modela u ovom području istraživanja i smanjenja patnje životinja na minimum.

Moždani udar rutinski se inducira u glodavaca privremenom ili trajnom okluzijom srednje cerebralne arterije (okluzija srednje cerebralne arterije; model MCAO). Ovaj model „MCAO” namijenjen je za eksperimentalnu reprodukciju fokalne cerebralne ishemije koja se pojavljuje u moždanom udaru i koristi se u velikoj mjeri za proučavanje mehanizama ozljeda, utvrđivanje mogućih ciljeva i ispitivanje mogućih neurozaštitnih tvari. Utvrđene su razlike u sojevima miševa i štakora te složeni i značajni utjecaj starosne dobi, spola i komorbiditeta kao što su dijabetes, hipertenzija i ateroskeloroza. Dok se u pretkliničkom istraživanju moždanog udara često koriste zdravi mladi mužjaci glodavaca, utjecaj čimbenika kao što su oni prethodno navedeni može se proučavati s pomoću modela s komorbidnim stanjima (npr. spontano hipertenzivni štakori, streptozotocinom (STZ) inducirani dijabetes u štakora). U takvim slučajevima s komorbidnim stanjima možda će biti potrebno ponnije promatranje kliničkih znakova i ranije humane krajnje točke (HEP).

U standardnom obliku studije životinje se dresiraju za izvođenje određenih testova ponašanja prije postupka MCAO-a. Za vrijeme terapijskog vremenskog okvira, utvrđenog u skladu s mehanizmom djelovanja lijekova i ciljem studije, životinje dobivaju ispitni spoj. Analiza ishoda treba uključivati podatke o veličini infarkta, stopi mortaliteta, učestalosti komplikacija (npr. subarahnoidno krvarenje), zajedno s funkcionalnom i neurološkom procjenom za praćenje napretka. Pokazalo se da je serijsko snimanje magnetnom rezonancom (MRI) jak alat za dobivanje podataka o razlikama u veličini infarkta tijekom vremena, ali i da može dati dodatne podatke o krvotoku ili stanju metabolizma. Isto tako, mogu se uključiti i histološke, biokemijske i molekularne krajnje točke.

Postoje razni testovi ponašanja koji se mogu primijeniti na modele moždanog udara. Najjednostavniji testovi obuhvaćaju sustave neurološkog ocjenjivanja, s pomoću kojih se vrši procjena globalnog neurološkog stanja i testove držanja udova za mjerenje motornih refleksa. Oni se općenito koriste za procjenu životinja u akutnoj fazi poslije moždanog udara. U dugotrajnim studijama mogu se koristiti složeniji testovi za procjenu senzornih i motornih funkcija (npr. bilateralni test ljepljivim trakicama, hodanje po štapu, test na rotirajućim osovinama ili test penjanja po ljestvama) i kognitivnih funkcija kao što je pamćenje (npr. testovi pasivnog izbjegavanja ili ocjenjivanje strategija učenja).

Dobra je praksa izvesti skupinu testova ponašanja, uključujući najmanje jedan za svaku fazu (akutnu i dugotrajnu) kako bi se prikupili sveobuhvatni podatci o utjecaju na senzorne, motorne i kognitivne funkcije. Ti se testovi moraju pomno izabrati kako bi se obuhvatili svi učinci mogućih terapijskih strategija. U ovom se tekstu ne prikazuju detaljni opisi svakog takvog testa ponašanja, uključujući raspored dresure, ali za sveobuhvatan pregled i analizu njihova korištenja vidi Schaar *et al.* (2010.).

Literatura

- Braeuninger S i Kleinschnitz C. Recent models of focal cerebral ischemia: procedural pitfalls and translational problems. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, studeni 2009.; 1.:8.
- Freret T i Bouet V. Improvements of the Stroke Model Guidelines – Animal body weight and long-term functional concerns. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, 2009.; 2.(2.): 28. – 31.
- Graham SM *et al.* Animal models of ischemic stroke: balancing experimental aims and animal care. *Comparative Medicine*, listopad 2004.; 54.(5.): 486. –496.
- Yanamoto H *et al.* Evaluation of MCAo stroke models in normotensive rats: standardized neocortical infarction by the 3VO technique. *ExpNeurol*, kolovoz 2003.; 182.(2.):261. – 74.
- Liu S *et al.* Rodent stroke model guidelines for preclinical stroke trials (1. izdanje). *Journal of experimental stroke and translational medicine*, siječanj 2009. 1.;2.(2.):2. – 27.

- Schaar KL *et al.* Functional assessments in the rodent stroke model. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, 2010.; 2.:13.; otvoreni pristup na <http://www.etsmjournal.com/content/2/1/13>
- Virley *et al.* A temporal MRI assessment of neuropathology after transient middle cerebral artery occlusion in the rat: correlations with behaviour. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000.;20.:563. – 582.

Studija

Učinkovitost nove terapijske tvari na model okluzije cerebralne arterije intraluminalnom žicom (MCAO) u štakora

U ovom primjeru 40 mladih mužjaka štakora Sprague-Dawley (300 – 350 g) bit će podvrgnuto trajnom MCAO-u korištenjem tehnike intraluminalne žice pod općom anestezijom. Štakore će se randomizirati (br = 10/skupini) kako bi primili bilo pomoćno sredstvo (10 ml/kg), bilo novu ispitnu tvar (spoj A) od 1, 3 ili 10 mg/kg, intravenoznom infuzijom u venu repa više od sat vremena, što počinje 30 minuta nakon MCAO-a. Sljedeće doze (bilo pomoćnog sredstva, bilo spoja A od 1, 3 ili 10 mg/kg) dat će se intraperitonealno 6 sati i 24 sata nakon MCAO-a. U početku će štakori biti smješteni u parovima u kavezima s tvrdim dnom s dubokom steljom i materijalom za gniježđenje. Hrana će se ograničiti prije dresure kako bi se olakšala uspješnost na testu penjanja po ljestvama, što je zadatak motiviran apetitom. Životinjama će se dati hrana *ad libitum* od 6 sati prije kirurškog zahvata do 6 dana nakon MCAO-a kako bi se unaprijedila postoperativna težina i oporavak.

Svakodnevno će se ocjenjivati funkcionalni ishod s pomoću sustava za neurološko ocjenjivanje (Bedersonova ljestvica; pogledati Schaar *et al.* 2010.) i testova ponašanja (bilateralni test ljepljivim trakicama i hodanje po štapu). Svakodnevno će se provoditi i test penjanja po ljestvama od 7. dana nakon MCAO-a kako bi se ostavilo dovoljno vremena za postoperativni oporavak prije ponovnog uvođenja ograničenja hrane. Ne očekuje se da će testovi ponašanja izazvati značajan stres. Anestezirani štakori slikat će se magnetnom rezonancom (MRI) 1., 7., 14. i 28. dan kako bi se procijenio volumen lezije. Sve će životinje biti usmrćene 28 dana nakon MCAO-a.

Početna očekivana procjena i razmatranje posebnih poboljšanja i humanih krajnjih točaka

Što se životinjama radi ovom studijom?	Što će životinje osjetiti? Koliko će patiti? Od čega bi im moglo biti gore?	Kako će se patnja smanjiti na minimum?	
	Negativni učinci	Metodologija i intervencije	Krajnje točke
Predoperativna dresura za testove ponašanja u razdoblju od 2 – 3 tjedna: bilateralni test ljepljivim trakicama (za kontralateralno zanemarivanje), hodanje po štapu (za koordinaciju stražnjih udova) i penjanje po ljestvama (za uspješno doticanje šapa prednjih udova)	Može izazvati minimalnu tjeskobu/strah prije nego što se životinje naviknu na testove jer ispitivanje obuhvaća prebacivanje životinja u nove prostorije/otvorene prostore.	Postupno navikavanje na ispitne aparate Mirno, empatično postupanje sa životinjama	Uklanjanje iz ispitivanja ako se primijete znakovi stresa Iz studije će se isključiti one životinje koje ne budu uspješne u skladu s osnovnim vrijednostima u prethodno utvrđenom roku.
Ograničenje hrane (85 – 90 % težine kod slobodnog hranjenja) predoperativno i od 7 dana nakon MCAO-a radi boljeg uspjeha na testu penjanja po ljestvama	Blaga glad; moguća frustriranost i tjeskoba	Gubitak mase neće biti veći od 10 %, inače će se prekinuti ograničenje hrane.	Ako se primijete problemi u ponašanju zbog nedovoljnog unosa hrane, životinje će se ukloniti iz studije.
Pod općom anestezijom,	Bol i nelagoda povezani s kirurškim	Uporaba odgovarajućih i	Životinje će biti usmrćene

<p>prolazna (90 min) okluzija MCA-a s pomoću intraluminalne žice uvedene kroz zajedničku karotidnu arteriju</p>	<p>zahvatom</p> <p>Mogućnost neočekivanih kirurških komplikacija, npr. subarahnoidno krvarenje, ipsilateralna retinalna ozljeda, nastajanje intraluminalnog tromba, edem mozga, uključivanje hipotalamusa s posljedičnom hipertermijom ili vremenskom nekrozom mišića. One se mogu pojaviti na nekoliko različitih načina, primjerice iznenadna nesvjestica, paraliza, teško naklanjanje glave, epileptički napadi.</p> <p>Averzivnost i mogući učinci anestezije na fiziološke varijable (kao što su hipotermija, hipotenzija, hipoksija)</p> <p>Slab unos hranjivih tvari zbog smanjene razine svijesti, poremećena mastikacija, slaba pokretnost, obično</p>	<p>minimalno averzivnih anestetika s odgovarajućom analgezijom (tj. učinkovitim i minimalno neurozaštitnim svojstvima)</p> <p>Dobro osposobljen kirurg koji koristi odgovarajuću aseptičnu kiruršku tehniku (s redovitim revizijama stopa uspješnosti)</p> <p>Održavanje homeostaze za vrijeme anestezije</p> <p>Uporaba standardiziranih jednostrukih vlakana i kirurške tehnike radi smanjenja varijabilnosti i komplikacija koje proizlaze iz velikih lezija</p> <p>Intenzivna postoperativna njega prvih 3 – 5 dana, uključujući</p>	<p>na human način ako se pojavi bilo što do dolje navedenog:</p> <p>značajni tehnički problem za vrijeme kirurškog zahvata izostanak potpunog oporavka od anestezije znakovi neočekivanih kirurških komplikacija ako gubitak tjelesne težine životinje bude veći od 20 % mase prije kirurškog zahvata, unatoč dodatnom hranjenju i/ili rehidraciji, ili ako ostanu nepokretne više od 24 sata.</p>
---	---	--	---

	<p>u prvih 48 sati poslije MCAO-a</p> <p>Stupanj lokomotornog deficita, koji bi mogao izazvati stres i/ili frustraciju</p>	<p>vanjske izvore topline</p> <p>Redovite provjere tjelesne težine; svakodnevno promatranje i zbrinjavanje rane</p> <p>Neotežan pristup hrani i vodi u razdoblju oporavka ili dodatna hrana (kaša, tekućina) i pomoć pri hranjenju prema potrebi; rehidracija (npr. injekcijom fiziološke otopine) prema potrebi</p>	
<p>Testovi ponašanja (bilateralni test ljepljivim trakicama i test hodanja po štapu) provode se svakodnevno od dana 1. do dana 28. nakon MCAO-a; test penjanja po ljestvama provodi se svakodnevno od dana 7. nakon MCAO-a</p>	<p>Životinjama bi zadatci mogli biti stresni ako su im narušene motorne sposobnosti.</p>	<p>Pratite pokazatelje ponašanja za tjeskobu ili stres.</p> <p>Životinje će neprestano promatrati iskusno osoblje.</p>	<p>Obično se određuje maksimalno vrijeme (krajnji rok) za izvedbu traženog zadatka i daje se konačna ocjena.</p>
<p>Davanje nove terapijske tvari s.c./i.v./i.p. prije i/ili nakon kirurškog zahvata</p>	<p>Prolazna nelagoda povezana s načinom davanja tvari</p>	<p>Davanje tvari u skladu s korištenjem dobre praske, najmanje moguće bolnim / stresnim putem / i</p>	<p>Ako se primijete bilo kakve teške nuspojave zbog novih terapijskih</p>

(profilaktički/terapeutski)	Ne očekuju se negativni učinci u razinama dane doze.	tehnikama u skladu sa znanstvenim ciljevima. Životinje će se pomno promatrati zbog negativnih učinaka testnih tvari.	tvari, životinje će biti usmrćene na human način.
Longitudinalni MRI pod anestezijom 1., 7., 14. i 28. dana nakon MCAO-a	Ponovljena anestezija Averzivnost i mogući učinci anestezije na fiziološke varijable (kao što su hipotermija, hipotenzija, hiopksija)	Korištenje odgovarajućih i minimalno averzivnih anestetika Održavanje homeostaze za vrijeme anestezije, uključujući terapiju tekućinama prije ili za vrijeme anestezije ako postoje problemi s dehidracijom i grijanje kako bi se održala normotermija	Provodi se eutanazija životinja koje se potpuno ne oporave od anestezije. Ako se nakon oporavka ne može održati homeostaza, životinje će biti usmrćene na human način.

Analiza

Ovaj se model smatra TEŠKIM jer uključuje kirurški postupak, negativne (ali obično prolazne) učinke MCAO-a na dobrobit životinje i mogućnost značajnih perioperativnih komplikacija. Međutim, negativni utjecaj na dobrobit životinja može se smanjiti intenzivnom postoperativnom njegom najmanje prvih 48 sati i pomnim praćenjem sljedeće faze – s brzim djelovanjem ako se pojave problemi. S eksperimentalnog stajališta, pozornost koja se pridaje poboljšanju i standardizaciji svakog pojedinog postupka može dovesti do smanjene incidencije komplikacija i varijabilnosti i stoga bolje kakvoće podataka i smanjenja broja korištenih životinja.

Stoga je odgovarajuća kategorija očekivane težine postupka TEŠKA.

Može li težina biti UMJERENA?

Iako očekivana težina ovog modela uvijek treba biti TEŠKA zbog gore navedenih razloga, incidencija teških učinaka može se smanjiti u rukama iskusnih kirurga uz pomoć stručnog veterinarskog nadzora i skrbi za životinje te dogovorenim ranim intervencijama u slučaju pojave komplikacija. U nekim slučajevima moguće je dati odobrenje za UMJERENU težinu postupka, ali samo za svaki slučaj zasebno za pojedine istraživačke skupine koje imaju dokazano uspješna iskustva baš s ovim modelom i za koje je poznato da mogu koristiti ovaj model bez izazivanja patnje koja je veća od umjerene.

Klinička zapažanja

Životinje se vrlo pomno prate u postoperativnom razdoblju. Prema potrebi daje se analgezija i lokalna pomoćna terapija.

Na kraju ovog modela navodi se primjer kombiniranog sustava neurokirurškog/kliničkog ocjenjivanja koji se koristi kao pomoć pri praćenju kliničkog stanja životinja tijekom postupka.

Rezultati

Sve životinje, osim jedne u skupini koja je primila pomoćno sredstvo, oporavile su se od kirurškog zahvata bez neočekivanih komplikacija zbog intenzivne perioperativne njege.

- Svih 10 životinja koje su primile pomoćno sredstvo pokazale su najnižu neurološku ocjenu tijekom studije i lošu uspješnost na testovima ponašanja u usporedbi s liječenim životinjama. Klinički rezultat bio je sličan liječenim životinjama odmah poslije MCAO-a (prvih 48 sati), a nakon toga su zabilježene razlike u životinja u skupini koja je primila pomoćno sredstvo:
 - Za 1/10 izvršena je eutanazija 2. dana nakon kirurškog zahvata zbog gubitka tjelesne mase > 20 % (unatoč dodatnom hranjenju i rehidraciji).

Ocjena: TEŠKA

- 6/10 razvilo je umjereni neurološki deficit, ali pokazalo minimalno poboljšanje kliničkog rezultata tijekom vremena.

Ocjena: TEŠKA

- 3/10 životinja razvilo je umjereni neurološki deficit i pokazalo postupno smanjenje kliničkog rezultata tijekom vremena, moguće zbog sposobnosti nadoknade i prilagodbe dugotrajnim neurološkim deficitima.

Ocjena: UMJERENA

- Svih 20 životinja koje su primile spoj A u manjim dozama (1 i 3 mg/kg) pokazalo je poboljšanje u neurološkom ocjenjivanju 48 sati poslije MCAO-a, zajedno s poboljšanjem u kliničkom ocjenjivanju.

Ocjena: UMJERENA

- Svih 10 životinja koje su primile spoj A u najvećoj dozi (10 mg/kg) pokazalo je poboljšanje u neurološkom ocjenjivanju u usporedbi sa skupinom koja je primila pomoćno sredstvo 24 sata poslije MCAO-a, samo minimalni (5 %) gubitak tjelesne težine nakon kirurškog zahvata i značajno poboljšanje u kliničkom ocjenjivanju 48 sati nakon MCAO-a.

Ocjena: UMJERENA

Ocjenjivanje stvarne težine postupka

Postupci na 7 životinja smatraju se **TEŠKOM** kategorijom; Postupci na 33 životinje smatraju se **UMJERENOM** kategorijom.

Sustav ocjenjivanja

Težina postupka ocjenjuje se kombinacijom općih kliničkih zapažanja (tjelesna težina, izgled, ponašanje, okoliš u kavezu) zajedno s postupkom uvjetovanim neurološkim ocjenjivanjem. Bendersonova ljestvica je globalna neurološka ocjena izrađena za mjerenje neuroloških oštećenja nakon moždanog udara. Koristi se ljestvica ocjenjivanja od 0 do 3, s 0 = normalno i 3 = najviša razina invaliditeta. Testovi obuhvaćaju fleksiju prednjih udova, otpor na lateralno guranje i kružno ponašanje.

ocjena 0: nije primijećen deficit

ocjena 1: fleksija prednjih udova

ocjena 2: smanjeni otpor na lateralno guranje (i fleksija prednjih udova) bez kruženja

ocjena 3: isto ponašanje kao i za ocjenu 2, s kruženjem

HEP: humana krajnja točka (*humane endpoint*)

	Ocjena
Izgled	
Gubitak mase od 5 – 10 %	1
Gubitak mase od 11 – 15 %	2
Gubitak mase od 16 – 20 %	3
Gubitak mase od 20 % +	HEP
Dlaka malo neuredna	1
Lagana piloerekcija	2
Izražena piloerekcija	3
Ponašanje	
Malo neprirodan hod	1
Izraženo neprirodan hod	2
Značajni problemi s pokretljivošću	3
Nepokretnost > 24 sata	HEP
Napetost i nervoza pri postupanju sa	2

Mjere	
Ocjena 1	Izvršite reviziju učestalosti praćenja.
4	Pružite dodatnu njegu, npr. više tekućine i vodenaste kaše.
5	Pregledajte napredak s veterinarom.
12	Izvršite humanu krajnju točku.

životinjama	
Izražena tjeskoba pri postupanju sa životinjama, npr. drhtanje, glasanje, agresivnost	3
Okoliš	
Malo neuredno gnijezdo	1
Gnijezdo jedva prepoznatljivo	2
Gnijezda nema	3
Neurološko ocjenjivanje	
Fleksija prednjih udova	1
Smanjen otpor na lateralno guranje (i fleksija prednjih udova) bez kruženja	2
Isto ponašanje kao za ocjenu 2, s kruženjem	3

Mjere – Imajte na umu da se kirurške komplikacije obično primijete u razdoblju oporavka neposredno nakon kirurškog zahvata.

Potrebno je pomno praćenje i stručna, empatična procjena tijekom prva 24 sata kako bi se osiguralo utvrđivanje negativnih učinaka i poduzimanje mjera za njihovo uklanjanje. Ako patnja bude veća od teške kategorije, životinje se usmrćuju na human način.

Primjer pojedinačnog obrasca za promatranje (dani 0. – 4.)

Dan	0.	1.	2.	3.	4.
<u>Izgled</u>					
Tjelesna masa (g) (ocjena)	320 (0)	292 (1)	285 (2)	287 (1)	292 (1)
<u>Stanje dlake</u>					
Dlaka neuredna / piloerekcija	1	1	0	1	0
<u>Ponašanja</u>					
Hod	3	2	2	2	1
Reakcija na postupanje sa životinjama	0	0	2	0	0
<u>Okoliš</u>					
Stanje gnijezda	3	2	1	0	0
<u>Postupkom uvjetovano neurološko ocjenjivanje</u>	2	2	1	1	1
Ukupna ocjena	9	8	8	5	3
Volumen lezije (ocjena s pomoću MRI-ja)*		11 %			

<u>Ostala zapažanja</u>	Životinja se oporavila od kirurškog zahvata bez događaja, nema komplikacija. Dozirana u 30 min i 6 sati.	Životinja se kreće oko kaveza i pokušava napraviti gnijezdo.	Testovi ponašanja, isprva tjeskobne, ali sve su završile testove, gnijezdo bolje građe .	Dlaka danas slabije očišćena, ali težina je stabilna i gnijezdo je dobro.	Završeni testovi ponašanja, životinje manje tjeskobne, hod se izraženo poboljšao.
--------------------------------	---	--	--	---	---

* „Volumen lezije” (ocjena s pomoću MRI-ja) navodi se za istraživača koji to polje popunjava na kraju studije. Ti se podatci zatim mogu usporediti s kliničkim zapažanjima i zapažanjima o ponašanju radi daljnjeg poboljšanja praćenja, skrbi o životinjama i postupaka.

Ilustrativni primjeri kategorije težine postupaka Model 5. – proizvodnja poliklonskih protutijela u kunića

Zadnji put ažurirano: 05/02/2013

Opći kontekst

Osnovni je cilj proizvodnje protutijela u laboratorijskih životinja dobivanje visokog titra, protuseruma visokog afiniteta za uporabu u pokusima ili dijagnostičkim testovima. Velik dio moderne biologije i biokemije oslanja se na dostupnost vrlo određenih protutijela za korištenje u raznim tehnikama kao što su imunohistokemija, ELISA-e (enzimski vezani imunosorbent testovi), imunoprecipitacija i imunoblot. Stoga je nužno proizvesti velike količine određenih protutijela na proteine ili peptide od neposrednog interesa za uspješnost brojnih osnovnih i primijenjenih istraživačkih programa.

U ovom se primjeru kunića koristi za proizvodnju protutijela na male peptide koje se smatra važnima u regulaciji stanične diobe, kao dio istraživačkog programa koji obuhvaća biokemijske studije stanične diobe u sisavaca.

Literatura

- Canadian Council on Animal Care smjernice za; proizvodnju protutijela (2002.). Preuzeti na: http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Antibody_production.pdf
- EFPIA/ECVAM (Diehl K-H *et al.*) (2001.) A good practice guide to the administration of substances and the removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology* **21.**: 15. – 23.
- JWGR (2001.) Refining procedures for the administration of substances. *Laboratory Animals* **35.**: 1. – 41.
- Keating SCJ, Thomas AA, Flecknell PA & Leach MC (2012.) Evaluation of EMLA cream for preventing pain during tattooing of rabbits: changes in physiological, behavioural and facial expression responses. *PLOS ONE* **7.(9.)**: e44437 (otvoreni pristup, <http://www.plosone.org>)
- Leenars M, Hendriksen CFM (2005.) Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendation. *ILAR Journal* **46.**:269. – 279.
- Stills HF (2005.) Adjuvants and antibody production: Dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR Journal* **46.**:280. – 293.

- UFAW/RSPCA (2008.) *Refining Rabbit Care: A Resource for Those Working With Rabbits in Research*. Southwater, UK: RSPCA (besplatno preuzimanje na: <http://www.rspca.org.uk/researchrabbits>)

Studija

Iz prethodnog iskustva utvrđeno je da bi jedan kunić trebao dati dovoljno materijala za svaki peptid od neposrednog interesa. Kunića će se smjestiti u obor s dnom u stabilnu skupinu kompatibilnih kunića (koje se isto tako koristi za proizvodnju protutijela) te će imati odgovarajući prostor za obogaćivanje okoliša, vježbanje i normalno društveno ponašanje (UFAW/RSPCA 2008.). Životinju će se imunizirati mješavinom protugena/adjuvansa. U prethodno određenim vremenskim točkama će se uzorkovati male količine krvi kako bi se utvrdila uspješnost imunizacije. Kad se dobije odgovarajući titar protutijela, životinji će se ispustiti krv pod dubokom anestezijom bez oporavka kako bi se prikupila protutijela u krvi.

Postupanje s kunićima može biti stresno i treba ga izvoditi samo stručno i empatično osoblje. Možda će biti teško protumačiti ponašanje kunića i dobra je praksa održavati znanje o literaturi o ponašanju i dobrobiti kunića. Primjerice, u novijoj literaturi navodi se da kunići mogu imati „bolno lice” u određenim okolnostima (Keating *et al.* 2012.) te bi trebalo istražiti mogućnost kako to iskoristiti kao alat za ocjenjivanje dobrobiti za svaki slučaj zasebno.

Zbog loše imunogeničnosti peptida kratkog lanca treba ga dati u kombinaciji s adjuvansom. Prije se koristio Freundov kompletni adjuvans (FCA), ali danas su dostupni sintetički adjuvansi koji su isto tako učinkoviti za ovaj postupak i minimalno iritiraju.

Prva očekivana procjena i razmatranje određenih poboljšanja i humanih krajnjih točaka

Što se životinjama radi ovom studijom?	Što će životinje osjetiti? Koliko će patiti? Od čega bi im moglo biti gore?	Kako će se patnja smanjiti na minimum?	
		Metodologija i intervencije	Krajnje točke
Imunizacija protugenom i adjuvansom; tri potkožne	Nelagoda nakon injekcije	Količina, formulacija i učestalost injekcija bit će u skladu sa	Ako postoje znakovi dulje nelagode, boli ili patnje

injekcije 8., 22. i 37. dana	U odgovoru na adjuvans mogle bi nastati bezbolne kvržice. Mogućnost (rijetko) ulceracije na mjestu davanja injekcije	smjernicama dobre prakse (npr. EFPIA/ECVAM ili JWGR), obično maksimalno četiri mjesta i 0,25 ml po mjestu. Svi čirevi odmah će se veterinarski liječiti na odgovarajući način.	(npr. neprestano obraćanje pozornosti na mjesto davanja injekcije ili kvržice) ili ako nastanu čirevi koji ne zacjeljuju, životinja će biti usmrćena na human način.
Uzorkovanje krvi kako bi se ocijenili odgovori protutijela (do 5 puta)	Hvatanje životinja, postupanje s njima i zadržavanje, što može biti stresno. Lakša nelagoda povezana s iglom Niski rizik od krvarenja ili nastajanja hematoma	Uzorci će se uzimati iz površinske (ušne) vene. Male količine krvi (< 5 ml) samo za provjeru titra protutijela Mjesto uzorkovanja mora se pritisnuti.	Ako postupak postane nepropisno stresan za životinju, uzimanje uzoraka će se odgoditi dok se ponašanje životinje ne vrati u uobičajeno stanje.
Ekssangvinacija pod općom anestezijom	Lakša nelagoda i moguća averzija na tvar za vrijeme indukcije anestezije	Koristi se minimalno averzivna anestetička tvar	Životinje će ostati pod anestezijom do ugibanja.

Analiza

Očekuje se samo blaga težina postupka zbog poboljšanja u uzgoju i skrbi, dobre prakse davanja lijekova i uzorkovanja te izbora minimalno iritantnog adjuvansa.

Stoga je odgovarajuća kategorija očekivane težine postupka **BLAGA.**

Može li se postupak dalje poboljšati?

Treba redovito revidirati mogućnost uporabe minimalno iritantnih adjuvansa i manje averzivnih anestetičkih tvari praćenjem literature i razgovaranjem o ovom problemu s kolegama. Može se osnovati program za navikavanje mladih kunića na postupanje za daljnje smanjenje stresa (UFAW/RSPCA, 2008.).

Klinička zapažanja

Budući da su u ovoj studiji očekuju samo slabi negativni učinci, koristio se osnovni model praćenja; tj. životinje su se svakodnevno provjeravale i zapažanja bilježila, ali strukturirani evidencijski obrazac nije se smatrao potrebnim.

Ilustrativni primjer obrasca za promatranje navodi se na kraju ovog modela.

Ocjenjivanje stvarne težine postupka

Zabilježena je prolazna, mala oteklina na jednom mjestu davanja injekcije, ali nije bilo potrebno liječenje. Kunić je kratkotrajno obraćao pozornost na mjesta davanja injekcije, ali vjerovalo se da to ukazuje samo na blagu nelagodu. Nije se primijetilo „bolno lice”.

Nisu zabilježeni negativni učinci zbog stvarnog uzorkovanja krvi iz ušne vene.

Smatralo se da je odgovarajuća kategorija stvarne težine postupka za ovu životinju **BLAGA**.

Primjer obrasca za promatranje

Proizvodnja protutijela u kunića – Postupak i obrazac za promatranje		
Datum	Tjelesna težina (kg)	Komentari
1.3.	3,5	Prethodno puštanje krvi – 5 ml ušna vena ; nisu primijećeni negativni učinci
2.3.		Nisu utvrđene nepravilnosti (NAD)
6.3.		NAD
7.3.		NAD
8.3.	3,6	Imunizacija – 0,25 ml x 2 mjesta s./c., nezatno obraćanje pozornosti na mjesta uboda (čišćenje) nekoliko minuta, zatim povratak u normalu
9.3.		NAD
10.3.		NAD
11.3.		NAD
12.3.		Mala, mekana bezbolna oteklina na mjestu LHS-a
13.3.		Još uvijek oteklina na mjestu LHS-a, nema pogoršanja

14.3.		Još uvijek prisutna oteklina na mjestu LHS-a, ali nije bolna na opip
15.3.	3,6	Oteklina nestala, sve je normalno.

21.3.		NAD
22.3.	3,6	Imunizacija – 0,25 ml x 2 mjesta s./c., kratko obraćanje pozornosti na mjesta davanja injekcije

28.9.		NAD
29.3.	3,7	NAD
30.3.		Testno uzimanje krvi – 2 ml ušna vena, nema negativnih učinaka

5.4.		NAD
6.4.	3,6	Imunizacija – 0,25 ml x 2 mjesta

14.4.	3,6	NAD
15.4.		Testno uzimanje krvi – 2 ml ušna vena, nema negativnih učinaka

26.4.		NAD
27.4.	3,6	Ekssangvinacija pod općom anestezijom, nema negativnih učinaka

Treba potvrđivati provjeru životinje najmanje na dnevnoj osnovi – npr. u kartonu pojedine životinje (kao gore) ili u kartonu prostorije.

Ilustrativni primjeri kategorija težine postupaka
Model 6. – proizvodnja i održavanje genetski izmijenjenih (GA) životinja
Zadnji put ažurirano: 05/02/2013

1. Opći kontekst

Korištenje genetski izmijenjenih (GA) životinja u istraživanju pridonosi razumijevanju funkcije gena i odgovarajućih proteina. Različiti fenotipi mogu imati razne učinke na dobrobit životinja i neki mogu izazvati bol, patnju ili stres. Iako su neki fenotipi i ishodi predvidljivi, mogu se pojaviti brojne neočekivane ili sekundarne osobine za vrijeme stvaranja genetski izmijenjenih linija i nije uvijek moguće točno predvidjeti težinu postupka. U praksi fenotip nije zahvaćen u brojnim genetski izmijenjenim linijama, a protokoli ocjenjivanja mogu se postaviti tako da se osigura prepoznavanje negativnih fenotipa. Alternativno se očekivani fenotip često može povezati s nepredviđenim sekundarnim fenotipima koji se pokazuju u različitim vremenskim točkama i mogu biti pod utjecajem različitih čimbenika iz okoliša.

Pri ocjenjivanju stvarne štete na životinji u obzir treba uzeti višestruke čimbenike kao što su vrsta mutacije, genotip, fenotip i rasplodne strategije (npr. izbjegavanje štetnih fenotipa homozigota parenjem heterozigota x divljeg tipa) te narav svih dodatnih znanstvenih ili uzgojnih postupaka i moguće učinke svih njih. Za učinkovito ocjenjivanje stanja dobrobiti životinja potrebna su sustavna i pravodobna zapažanja, i za vrijeme progresije kolonija i za vrijeme eksperimentalne faze kolonije.

Nove linije treba pomno pratiti i podvrgnuti standardnom ocjenjivanju dobrobiti. Kompetentno i na odgovarajući način obučeno osoblje treba pojedinačno ocijeniti sve linije za vrijeme progresije i održavanja kolonije, a podatke o posebno primijećenim negativnim učincima treba usporediti i prijaviti. Licencirano osoblje treba primijeniti sve potrebne znanstvene postupke i zajedno s osobljem koje provodi skrb pratiti i bilježiti sve učinke na životinje. Treba odrediti očekivane humane krajnje točke u odnosu na parametre kao što su gubitak težine, tjelesno stanje i ponašanja od interesa, zajedno s određenim razvojnim obilježjima. Nijednu životinju ne treba ostaviti na životu ako prekorači predviđenu granicu težine postupaka, osim ako su od nužnog znanstvenog interesa, a i tada samo uz odobrenje nadležnog tijela.

Narav, pravodobnost i trajanje zapažanja ovisi o brojnim čimbenicima, a ne samo o primijenjenoj mutaciji. Primjerice, genetska podloga i uvjeti u okolišu u kojima se životinje održavaju mogu znatno promijeniti izražavanje fenotipa. Te određene čimbenike treba točno zabilježiti kako bi se olakšale bolje usporedbe između objekata i praćenja genetski izmijenjenih životinja općenito. U obzir treba uzeti i životni vijek svake linije u određenom objektu jer neki fenotipi kasno nastupaju i stoga će ih se primijetiti samo ako se životinje zadrži dulje vrijeme.

Literatura

RSPCA GA Passport Working Group (2010.) *GA Passports: The Key to Consistent Animal Care*. Southwater, UK: RSPCA (preuzeti na: <http://www.rspca.org.uk/sciencegroup/researchanimals/implementing3rs/gapassport>)

Wells DJ *et al.* (2006.) *Assessing the welfare of genetically altered mice* *Laboratory Animals* **40.(2.)**: 111. – 114. (preuzeti na: <http://www.nc3rs.org.uk/downloaddoc.asp?id=356&page=231&skin=0>)

2. Primjeri

Tri primjera u poglavljima od 2.1. do 2.3. u nastavku prikazuju kako procijeniti težinu postupka u genetskih izmijenjenih miševa, uključujući reviziju razvojnih prekretnica, utjecaj postupka i razvoj kolonije. Svaki je primjer usmjeren na načela ocjenjivanja težine postupka, a ne na uzimanje u obzir svakog mogućeg scenarija tijekom razvoja kolonije.

Stvaranje svakog modela slijedi standardizirane postupke koji zahtijevaju kirurško pripremanje vazektomiranih mladih mužjaka, rukovanje embrijima i njihovu kiruršku implantaciju u pseudoskotnu ženku primatelja. Pretpostavlja se dobra praksa za asepsu, zbrinjavanje boli i stručno znanje kirurga.

Potvrđivanje prisutnosti potomstva izvedenog iz utemeljiteljske matične linije obavlja se uzorcima tkiva koji se dobivaju kao nusproizvod označavanja (zarezivanje uha) ili najmanje invazivnom metodom koja daje dovoljno tkiva za ocjenjivanje genotipa. Strategija fenotipiziranja svake linije ovisi o genu, području istraživanja i predviđenim učincima. Ocjenjivanje težine određuje se nizom standardiziranih zapažanja.

2.1 Model genetski izmijenjenog miša – *GeneA*^{tm1a(Funding)Lab}

2.1.1 Opći kontekst

Stvorena je kolonija miševa s novom mutacijom u *GeneA* koja je bila namijenjena liniji embrionalnih matičnih stanica izvedenih iz podloge C57BL/6N s nepoznatim fenotipskim potencijalom. Model se održavao na definiranoj podlozi (C57BL/6N). Kad je izvršen prijenos utemeljiteljske matične linije miševa G1, provedeno je osnovno ocjenjivanje dobrobiti s pomoću 30 mladunaca iz 3 – 5 okota neovisnih parenja. Potomstvo se pratilo prema definiranim prekretnicama u razvoju kolonije – pri okotu, 14 dana poslije okota (zajedno s označivanjem mladunaca i oporavkom tkiva za genotipiziranje) i pri odbijanju. Oblikovan je odgovarajući obrazac za ocjenjivanje na temelju obrasca za ocjenjivanje dobrobiti genetski izmijenjenih životinja (Wells *et al.* 2006.). Biotehnolog je pratio mladunce promatranjem kaveza, a voditelji kolonije pratili su genotipske omjere. Miševi su grupno smješteni nakon odbijanja, gdje je to bilo moguće, u kaveze s odvojenom ventilacijom za svaki kavez sa steljom, materijalom za gniježđenje i obogaćivanje okoliša prema potrebi. Biotehnolozi su vršili ocjenjivanja promatranjem kaveza za vrijeme svakodnevnih interakcija dok miševi nisu postali spolno zreli. Provodilo se praćenje dugotrajnog ocjenjivanja negativnih učinaka na dobrobit povezanih sa starosnom dobi i održavala evidencija za matično leglo i buduće rasplodno leglo. Sva su zapažanja uspoređena sa sojem koji je podloga te je provedeno ocjenjivanje relevantnosti.

2.1.2 Očekivana procjena

Što se životinjama radi ovom studijom?	Što će životinje osjetiti? Koliko će patiti? Od čega bi im moglo biti gore?	Kako će se patnja smanjiti na minimum?	
	Negativni učinci	Metodologija i intervencije	Krajnje točke
Osnovni učinci genetske izmjene	Genetska modifikacija može dovesti do klinički negativnih učinaka.	Neprestano promatranje kaveza Ocjenjivanje dobrobiti u	Ako se prekorači umjerena težina postupka, životinje će biti

	<p>U slučaju da su oni nepredvidljivi svaka naznaka da se životinja s mutacijom odmaknula od normalnih fizičkih parametara ili parametara za ponašanje (tj. oni koji su poznati pojavljuju se u fenotipima povezanim s genetskom podlogom i/ili kontrolama divljeg tipa) mogla bi upućivati na problem s dobrobiti.</p>	<p>definiranim razvojnim vremenskim točkama: okot, odbijanje i spolna zrelost</p> <p>Ovisno o naravi utvrđenog negativnog učinka, primjenjuju se odgovarajući čimbenici olakšavanja gdje je to moguće kao što su izmijenjene rasplodne strategije ili poboljšanja uzgoja (npr. više materijala za gniježđenje kako bi se poboljšala narušena termoregulacija).</p>	<p>usmrćene.</p>
<p>Uzorkovanje tkiva za genotipiziranje</p>	<p>Moguća bol i/ili stres izazvan metodologijom uzorkovanja tkiva, npr. bušenje/zarezivanje uha ili „rezanje” repa</p> <p>Biopsija repa obično se koristi kad su potrebne veće količine DNK-a, ali može izazvati i kratkotrajnu i dugotrajnu bol (potonju zbog nastanka neuroma).</p>	<p>Kad se pojedinačne životinje označava s pomoću zarezivanja uha, dobra je praksa za genotipiziranje koristiti tkivo uha ako je moguće.</p> <p>Pri „rezanju” repa treba uzeti najmanju količina repa (imajući na umu da ponavljanje uzorkovanja nije nimalo poželjno). Prema potrebi treba koristiti anesteziju i analgeziju i odmah spriječiti prekomjerno krvarenje.</p> <p>Promjene pri manje invazivnim</p>	<p>Nije primjenjivo jer bi ovaj postupak trebalo provesti „samo jednom” i nije vjerojatno da će izazvati bol ili patnju na razini za koju će biti potrebno usmrćivanje na human način.</p>

		tehnikama treba pratiti, lokalno ocijeniti i provoditi kad god je to izvedivo.	
Fenotipiziranje	Inducirano stresom pri postupanju sa životinjama ili primjeni testiranja fenotipa, npr. stres od stavljanja u nepoznati okoliš, davanje eksperimentalnih spojeva za induciranje odgovora, praćenje infekcije, anestezija i zadržavanje zbog slikanja itd.	Osposobljavanje osoblja koje provodi fenotipiziranje za stručno, empatično i standardizirano postupanje sa životinjama i promatranje Uporaba anestezije za vrijeme slikanja ili bolnih postupaka Strukturiranje testova fenotipa za promjenu s najmanje invazivnih (npr. promatranje ponašanja na otvorenom prostoru) na najinvazivnije (npr. postupci koji zahtijevaju anesteziju)	Ako mutacija izaziva teški odgovor na testiranje fenotipa, ostvaruju se human krajnje točke i životinje se usmrćuju na human način.

Gen koji se istražuje novi je mutant s inače nepoznatim negativnim učincima. Iskustvo ove ustanove pokazalo je da velika većina sličnih modela u načelu pokazuje blagi fenotip. Međutim, povremeno model može neočekivano pokazati umjerene kliničke znakove i stoga bi se na toj osnovi ovaj primjer mogao klasificirati kao očekivano UMJEREN.

2.1.3 Rezultati

Prva procjena u neonatalnih životinja (pri okotu):

Boja mladunaca (samo za neonatuse)	Normalna
Aktivnost mladunaca (samo za neonatuse)	Normalna
Mrlje od mlijeka (samo za neonatuse)	Prisutne
Leglo	Svi su mladunci bili u skladu s osnovnim parametrima za veličinu i homogenost legla, razvoj i rast mladunaca.

Provedeno je praćenje sljedećih pokazatelja 14. dan poslije okota i odbijanja:

Opći izgled	Svi su mladunci morfološki „normalni”. Nisu primijećene naznake izobličenosti.
--------------------	---

Veličina, oblikovanje i rast	Normalan rast, u skladu sa standardnom krivuljom rasta za genetsku podlogu
Stanje dlake	Normalo
Ponašanje – držanje, hod, aktivnost i interakcije s okolinom	Normalna ponašanja i interakcije među svim miševima u kavezu; nije primijećena hiperaktivnost ili agresivnost.
Klinički znakovi	Nisu utvrđeni
Relativna veličina	Normalna u odnosu na genetsku podlogu
Brojke	Stopa mortaliteta prije odbijanja normalna u odnosu na genetsku podlogu

Klinička zapažanja

Sva zapažanja i omjeri neonatalnih mladunaca do odbijanja smatraju se normalnima u odnosu na genetsku podlogu (C57BL/6N) s homozigotnim, heterozigotnim i divljim tipom miševa koji su se okotili u normalnom Mendelovu omjeru.

U 4. tjednu starosti homozigotni i divlji tip kontrolnih miševa (7 + 7) podvrgnuti su nizu opservacijskih i blagih postupovnih testova kao što su SHIRPA, dismorfologija, otvoreno polje, klinička kemija krvi, DEXA i rendgensko snimanje sustavom Faxitron u razdoblju od 16 tjedana. Na kraju pokusa fenotipska analiza naglasila je smanjenje klirensa glukoze u homozigotnih miševa nakon intraperitonealnog testa tolerancije glukoze (ipGTT). Iako je došlo do smanjenja klirensa glukoze za vrijeme postupka, poslije postupka sve životinje vratile su se na svoje bazalno stanje i nisu primijećeni daljnji negativni učinci.

2.1.4 Analiza rezultata

Ocjenjivanje stvarne težine postupka

Nakon osnivanja kolonije u održavanju i progresiji kolonije korišteni su parovi iz legla heterozigotnih miševa i miševa divljeg tipa. Nisu primijećeni štetni fenotipi ni u kojih miševa koji su korišteni za rasplod i održavanje pa se smatralo da oni ne pokazuju negativne učinke. Budući da se ne očekuje štetni fenotip, ova bi linija stoga mogla postati homozigotna i održavati se bez odobravanja projekta.

Gore navedeno parenje heterozigotnih x heterozigotnih miševa proizvelo je homozigotne miševe. Skupina tih miševa iskorištena je za standardni pregled fenotipa koji se sastoji od niza blagih protokola, uključujući uvođenje igle za uzorkovanje krvi za vrijeme i.p. testa tolerancije glukoze. Kontrole divljeg tipa istodobno su bile podvrgnute testovima. Kumulativni učinak na miševe bio bi blagi zbog uzorkovanja krvi i naknadnih postupaka fenotipiziranja, za razliku od ukupnog učinka genetske izmjene.

Sažetak

Rasplod i održavanje – nema negativnih učinaka

Homozigotni + kontrolni miševi – BLAGA kategorija – na temelju testova velikih populacija (nije učinak genetske izmjene)

Ukratko, može se smatrati da ova linija genetski izmijenjenih miševa ima fenotip koji nije štetan. Rasplod osnovanih linija ne bi zahtijevao odobravanje projekta u skladu s Direktivom.

2.2 Model genetski izmijenjenog miša – *Tg(GeneB)*^{Labcode}

2.2.1 Opći kontekst

Stvorit će se kolonija miševa s mutacijom s pretjeranim izražavanjem transgena kao model za proučavanje jednog oblika raka. Linija će se oblikovati na podlozi C57BL/6N. Međutim, nastup i brzina razvoja tumora ne mogu se definirati i zahtijevaju ocjenjivanje kao dio karakterizacije modela. Kad se uspostave utemeljiteljske matične linije, provodi se osnovno ocjenjivanje dobrobiti kako je opisano u poglavlju 2.1. Najkorisnija linija će se razviti za proučavanje ove vrste leukemije.

2.2.2 Očekivana procjena

Što se životinjama radi ovom studijom?	Što će životinje osjetiti? Koliko će patiti? Od čega bi im moglo biti gore?	Kako će se patnja smanjiti na minimum?	
	Negativni učinci	Metodologija i intervencije	Krajnje točke
Ocjenjivanje i karakterizacija razvoja tumora	Gubitak mase i stanja će napredovati s razvojem raka. Potkožne otekline mogu izazvati nelagodu, utjecati na normalno ponašanje, držanje ili sposobnost kretanja. Životinje bi mogle biti više prijemljive	Intervencije će se temeljiti na svakodnevnom promatranju s pomoću kriterija kao što su gubitak mase, gubitak tjelesnog stanja, letargija itd. Svakodnevno promatranje i praćenje općeg zdravlja i rasta	Matične i rasplodne životinje koje pokazuju kliničke znakove koji nisu u sklopu eksperimentalnih postupaka kao što su gubitak mase veći od 15 %, loše stanje dlake, letargija bit će usmrćene na human način. Ako dođe do ulceracije tumora ili

	na bolest zbog kompromitiranog imunološkog sustava.	tumora	<p>ako tumor sprečava normalno ponašanje, držanje ili sposobnost kretanja ili preraste 1,2 cm u promjeru, životinje će biti usmrćene na human način.</p> <p>Životinje koje pokazuju znakove interkurentnog oboljenja bit će usmrćene na human način.</p>
--	---	--------	--

Model koji se istražuje mutirat će se kako bi se proizveo predviđeni genetski nered. Nastup bolesti ne može se jednostavno predvidjeti, ali mogu se prethodno definirati klinički znakovi koji će omogućiti karakterizaciju nastupa bolesti. Nakon karakterizacije model će trebati održavati kako bi se mogao koristiti za vrijeme kasnijih eksperimentalnih studija na mogućim liječenjima ove vrste raka koji se proučava. U skladu s tim, ovaj bi se primjer moglo klasificirati kao očekivano UMJEREN.

2.2.3 Rezultati

Ocjenjivanje dobrobiti izvršeno je u prethodno navedenom poglavlju 2.2. Nisu primijećene nepravilnosti u razvojnim prekretnicama, rastu do spolne zrelosti. Kolonija je proširena matičnim i budućim rasplodnim životinjama parenima od 10. tjedna starosti radi održavanja kolonije i proizvodnje novih eksperimentalnih životinja. U tom su vremenu životinje praćene i primijećen je rast tumora od 18. tjedna starosti u 60 % životinja s mutacijom. Kliničko trajanje bolesti bilo je između 4 i 6 tjedana, kad je životinje trebalo eutanazirati.

2.2.4 Analiza rezultata

Ocjenjivanje stvarne težine postupka

Primijećeno je da su životinje s mutacijom razvile tumore u 60 % životinja od 18. tjedna starosti. U skladu s rasplodnom strategijom životinje su se parile od 10. tjedna starosti. Smatralo se da je potencijal da rasplodni parovi razviju tumore dovoljan da izmijeni rasplod i održavanje. Rasplodni parovi zatim su se parili od 6. tjedna starosti, a parovi su rastavljani do 12. tjedna starosti. Mladi mužjaci su usmrćivani. Matične i rasplodne ženke pratilo se svakodnevno radi otkrivanja ranih znakova razvoja tumora. Životinje koje se nisu koristile ili nisu bile potrebne usmrćene su na human način prije nastupa bilo kakvih kliničkih znakova.

Sažetak

Životinje mlađe od 18 tjedana starosti – nema negativnih učinaka

Životinje od 18 tjedana starosti razvile su tumor – BLAGA kategorija zbog ranih kliničkih krajnjih točaka

Životinje od 18 tjedana starosti razvile su tumore i bile izdane za uporabu – BLAGA ili UMJERENA kategorija ovisno o primjeni kliničkih krajnjih točaka.

2.3 Model genetski izmijenjenog miša – *GeneC*^{tm1a(Funding)Lab}

2.3.1 Opći kontekst

Kolonija miševa s mutacijom u *GeneC* namijenjena za liniju embrijskih matičnih stanica izvedenih iz podloge C57BL/6N s poznatim fenotipskim potencijalom stvorena je za ispitivanje ponašanja i pamćenja. Model se održavao na definiranoj podlozi (C57BL/6N). Nakon prijenosa miša G1 iz utemeljiteljske matične linije izvršeno je osnovno ocjenjivanje dobrobiti.

2.3.2 Očekivana procjena

Kao u poglavlju 2.1., istražuje se gen koji je novi mutant. Namjera je koristiti ovaj model u budućim studijama ponašanja kojima će se ispitivati učinkovitost novih farmaceutskih spojeva. Iskustvo u ovoj ustanovi pokazalo je da velika većina sličnih modela općenito pokazuje blagi fenotip. Međutim, povremeno model neočekivano pokazuje umjerene kliničke znakove i stoga se u skladu s tim ovaj primjer može klasificirati kao očekivano UMJEREN.

2.3.3 Rezultati

Sva zapažanja i omjeri smatraju se normalnima s obzirom na genetsku podlogu ovog modela (C57BL/6N) s homozigotnim, heterozigotnim i divljim tipom miševa okoćenih u normalnim Mendelovim omjerima.

U 4. tjednu starosti homozigotni i divlji tip kontrolnih miševa podvrgnuti su nizu promatranja i testova radi ocjenjivanja učenja i pamćenja. Ti su testovi provedeni u razdoblju od 10 tjedana. Na kraju ove fenotipske analize nisu primijećeni štetni fenotipi. Model je zatim korišten za ispitivanje učinkovitosti novih farmaceutskih spojeva.

Rasplodom heterozigotnih miševa nastale su zdrave homozigotne životinje koje su pokazivale reproduktivnu uspješnost sličnu soju koji je podloga. U tom smislu, za smanjenje broja životinja korištena je rasplodna strategija homozigotnih parenja. Za razliku od izvornog parenja, u kojem su homozigotni miševi izvedeni iz parenja heterozigotnih x heterozigotnih miševa, nova grupa homozigotnih životinja izvedenih iz parenja homozigotnih roditelja činila se kržljavom i nije uspjela u potpunosti vratiti svoju veličinu i težinu u usporedbi s braćom i sestrama.

Iako je ova linija izvorno bila namijenjena kao model za ponašanje i pamćenje, daljnja analiza provedena je na tkivu i krvi koji su dobiveni od tih životinja. Za vrijeme analize rezultata biokemije krvi i kasnijeg pregledavanja literature utvrđeno je da je *GeneC* bazični transportni protein koji se vezuje uz vitamin B12. Brisanjem proteina *GeneC* došlo je do pucanja u izvanstaničnom transportnom mehanizmu što je dovelo do oštećenja u sintezi DNK-a i metabolizmu masnoća i proteina. Učinak ove mutacije ne bi se vidio u miševa koje je okotila heterozigotna ženka jer se izvor vitamina B12 u majke prenosi *in utero* s pomoću placente na razvojni fetus. Izvorne životinje s isključenim genom stoga su imale

dovoljno pohranjenog B12 za preživljavanje i napredovanje do barem 16 tjedana starosti što osigurava normalan rasplod i plodnost u usporedbi sa sojem koji je podloga.

2.3.4 Analiza rezultata

Ocjenjivanje stvarne težine postupka

Ovaj primjer pokazuje da održavanje kolonije može imati velik i često neočekivan učinak na miševe. Prema prethodno dostupnim podacima i rezultatima primarnog rasploda i fenotipiziranja, ova kolonija ne bi izgledala znakovito. Logično je da i održavanje kolonije strategijom homozigotnog parenja normalno osiguralo proizvodnju minimalnih brojeva životinja, što je poželjno kako bi se korištenje životinja smanjilo na minimum. Nepredviđeni štetni fenotipi mogu se pojaviti u linijama koje su prethodno održavane kao normalne životinje bez odobravanja projekta. Kao posljedica negativnih učinaka na dobrobit životinja u ovom primjeru ovaj bi model trebalo vratiti na odobravanje projekta ako se primjenjuje ova vrsta rasplodnog programa.

Sažetak

Uzgoj i održavanje heterozigotnih parova – bez negativnih učinaka

Uzgoj i održavanje homozigotnih parova – UMJERENA težina za potomstvo ove generacije zbog kržljivosti i nemogućnosti napredovanja

Primjer 2.3. – To naglašava potrebu za prijenosom točnih i korisnih podataka o dobrobiti između ustanova ako postoji mogućnost pojavljivanja štetnih fenotipa, primjerice u obliku „mišje putovnice”ⁱ.

ⁱ RSPCA GA Passport Working Group (2010.) *GA Passports: The Key to Consistent Animal Care*. Southwater, UK: RSPCA (preuzeti na: <http://www.rspca.org.uk/sciencegroup/researchanimals/implementing3rs/gapassport>)

KONTAKT S EU-om

OSOBN0

U cijeloj Europskoj uniji postoje stotine informacijskih centara Europe Direct. Adresu najbližeg centra možete pronaći na: https://europa.eu/european-union/contact_hr

TELEFONOM ILI E-POŠTOM

Europe Direct je služba koja odgovara na vaša pitanja o Europskoj uniji. Možete im se obratiti:

- na besplatni telefonski broj: **00 800 6 7 8 9 10 11** (neki operateri naplaćuju te pozive),
- na broj: **+32 22999696** ili
- e-poštom preko: https://europa.eu/european-union/contact_hr

TRAŽENJE INFORMACIJA O EU-u

NA INTERNETU

Informacije o Europskoj uniji na svim službenim jezicima EU-a dostupne su na internetskim stranicama Europa: https://europa.eu/european-union/index_hr

PUBLIKACIJE EU-a

Besplatne publikacije EU-a i publikacije EU-a koje se plaćaju možete preuzeti ili naručiti preko internetske stranice: <https://publications.europa.eu/hr/publications>. Za više primjeraka besplatnih publikacija obratite se službi Europe Direct ili najbližemu informacijskom centru (vidjeti https://europa.eu/european-union/contact_hr).

ZAKONODAVSTVO EU-a I POVEZANI DOKUMENTI

Za pristup pravnim informacijama iz EU-a, uključujući cjelokupno zakonodavstvo EU-a od 1952. na svim službenim jezičnim verzijama, posjetite internetske stranice EUR-Lex: <http://eur-lex.europa.eu>

OTVORENI PODATCI IZ EU-a

Portal otvorenih podataka EU-a (<http://data.europa.eu/euodp/hr>) omogućuje pristup podatkovnim zbirkama iz EU-a. Podatci se mogu besplatno preuzimati i ponovno uporabiti u komercijalne i nekomercijalne svrhe.

